



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E
PRODUZIONI ANIMALI

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, PATOLOGIA ED
IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA VETERINARIA

XXVII CICLO

Coordinatore: Chiar.mo Prof. G. Cringoli

TESI DI DOTTORATO

**“Il complesso orexinergico nell'apparato genitale maschile di
alcuni mammiferi. Aspetti morfo-funzionali e patologici”**

Tutor:

Chiar.mo Prof. A. Vittoria

Candidata:

Dr. Giovanna Liguori

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

INDICE

RIASSUNTO	pag.8
------------------	-------

SUMMARY	pag.13
----------------	--------

Capitolo 1: INTRODUZIONE	pag.18
---------------------------------	--------

1.1. Struttura e funzione delle orexine A e B e dei recettori 1 e 1 per le orexine	pag.18
1.2. Espressione e funzioni delle orexine e dei loro recettori nel sistema nervoso centrale	pag.35
1.3. Il complesso orexinergico negli organi periferici	pag.46
1.4. Espressione e funzione delle orexine nell'apparato genitale	pag.51
1.5. Le gonadi maschili e la spermatogenesi nei mammiferi	pag.56
1.6. Anatomia e fisiologia dell'apparato genitale maschile del ratto e dell'alpaca (Vicugna pacos)	pag.63
1.7. Anatomia e fisiologia della prostata umana	pag.69

1.8. Ruolo delle orexine nei fenomeni neoplastici	pag.71
---	--------

Capitolo 2: MATERIALI E METODI pag.75

2.1. Reagenti chimici ed anticorpi	pag.75
2.2. Prelievo dei campioni	pag.77
2.3. Immunoistochimica	pag.78
2.4. Preparazione di omogenati di tessuto	pag.79
2.5. Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting	pag.80
2.6. Estrazione di RNA da tessuti	pag.82
2.7. RT-PCR	pag.83
2.8. Test eseguiti in vitro su sezioni di testicolo di ratto e di alpaca per la determinazione del testosterone	pag.86
2.9. Colture cellulari	pag.89
2.10. Saggio di proliferazione cellulare	pag.90
2.11. Determinazione dei livelli di cAMP	pag.91
2.12. Misurazione del Ca^{++} intracitoplasmatico	pag.92

2.13. Saggio di traslocazione nucleare dei recettori per gli androgeni (AR)	pag.93
---	--------

Capitolo 3: RISULTATI

pag.95

3.1. Localizzazione immunoistochimica dell'OX1R nel testicolo del ratto	pag.95
---	--------

3.2. Espressione dell'mRNA codificante per l'OX1R e della relativa proteina nel testicolo del ratto	pag.96
---	--------

3.3. Effetto dell'OxA e del MIS sulla secrezione di testosterone (T)	pag.97
--	--------

3.4. Rilevazione immunoistochimica dell'OxB e dell'OX2R nel testicolo del ratto	pag.99
---	--------

3.5. Espressione dell'mRNA codificante per l'OX2R e della relativa proteina nel testicolo del ratto	pag.101
---	---------

3.6. Azione dell'OxB sulla secrezione del testosterone (T) nel testicolo del ratto	pag.102
--	---------

3.7. Effetto dell'OxB sulla de-fosforilazione dell'ERK 1/2 mediato dall'OX2R	pag.103
--	---------

3.8. Localizzazione dell'OxA e dell'OX1R nel testicolo dell'alpaca	pag.104
--	---------

3.9. Espressione della prepro-orexina e dell'OX1R negli estratti tissutali del testicolo di alpaca	pag.105
3.10. Effetto in vitro dell'OxA e del MIS sulla steroidogenesi dell'alpaca	pag.106
3.11. Valutazione immunoistochimica dell'OxB e dell'OX2R nel testicolo dell'alpaca	pag.107
3.12. Espressione dell'OX2R in estratti tissutali del testicolo di alpaca	pag.108
3.13. Valutazione immunoistochimica dell'OxA e dell'OX1R nell'epididimo dell'alpaca	pag.109
3.14. Espressione della prepro-orexina e dell'OX1R in estratti tissutali di testicolo di alpaca	pag.110
3.15. Localizzazione immunoistochimica dell'OxA e dell'OX1R nella prostata normale ed iperplastica	pag.111
3.16. Espressione dell'mRNA codificante per la prepro-orexina e per l'OX1R e presenza delle relative proteine nella prostata normale ed iperplastica	pag.112
3.17. Presenza dell'OX1R nella linea cellulare prostatica normale PNT1A	pag.113

3.18. Ruolo dell'OxA sulla proliferazione, produzione di cAMP e rilascio del Ca^{++} intracitoplasmatico in cellule PNT1A	pag.114
3.19. Valutazione immunoistochimica dell'OxA e dell'OX1R nel carcinoma prostatico umano	pag.116
3.20. Espressione dell'mRNA codificante per la prepro-orexina e per l'OX1R e delle relative proteine nel carcinoma prostatico	pag.117
3.21. Espressione dell'OX1R nella linea cellulare carcinomatosa LNCaP	pag.118
3.22. Ruolo dell'OxA sulla proliferazione cellulare, produzione di cAMP e secrezione del Ca^{++} intracitoplasmatico in cellule LNCaP	pag.119
3.23. Effetto dell'OxA sulla traslocazione nucleare dei recettori per gli androgeni (AR) nella linea cellulare LNCaP	pag.120
Capitolo 4: TAVOLE	pag.122
Capitolo 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.147
Capitolo 6: LEGENDA TAVOLE	pag.162
Capitolo 7: BIBLIOGRAFIA	pag.179

Capitolo 8: RINGRAZIAMENTI

pag.214

Capitolo 9: ELENCO DEI LAVORI PUBBLICATI

pag215

RIASSUNTO

Le orexine A (OxA) e B (OxB) sono due peptidi ipotalamici scoperti nel 1998 da due gruppi di ricerca diretti da Sakurai T. e de Lecea L. nel 1998 che lavorarono indipendentemente l'uno dall'altro. Tali peptidi derivano dal taglio proteolitico della molecola precursore nota come prepro-orexina. Le orexine esplicano la loro azione biologica attraverso il legame con due recettori definiti recettore 1 e 2 per le orexine (OX1R ed OX2R) e sono localizzate nel sistema nervoso centrale ed in organi periferici quali le ghiandole surrenali, i reni, e vari segmenti degli apparati digerente e genitale. Le orexine influenzano numerose funzioni organiche tra le quali l'assunzione degli alimenti, il comportamento sessuale, il ritmo circadiano, le funzioni cardiache e le relazioni neuroendocrine. Scopo del presente lavoro è di indagare la presenza della prepro-orexina, dell'OxA, dell'OxB, dell'OX1R e dell'OX2R in alcuni organi dell'apparato genitale maschile di diverse specie animali e dell'uomo in condizioni fisiologiche e patologiche utilizzando metodiche di immunoistochimica (IHC), western blotting (WB), reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) e colture in vitro di sezioni tissutali e linee cellulari.

Gli organi presi in considerazione per la ricerca sono stati il testicolo del ratto e dell'alpaca, l'epididimo dell'alpaca e la prostata umana normale, iperplastica e neoplastica. Frammenti tissutali sono stati fissati in liquido di Bouin per 24-48 ore, inclusi in Paraplast e tagliati microtomicamente in sezioni di vario spessore le quali sono state colorate con la metodica dell'IHC all'avidina-biotina. Un'altra quota di frammenti tissutali è stata crioconservata a -80°C e quindi sottoposta alle tecniche del WB e dell'RT-PCR. Sezioni di tessuto spesse 1-2 mm sono state prelevate dal testicolo del ratto e dell'alpaca e sottoposte ad analisi in vitro per la valutazione dell'effetto delle orexine sulla steroidogenesi tissutale. Infine linee cellulari prostatiche normali e patologiche sono state coltivate in vitro per studiare alcuni aspetti metabolici in esse indotte dalla presenza di orexine.

L'OxA, l'OxB ed i relativi recettori 1 e 2 risultano presenti in diversi citotipi testicolari nel ratto e nell'alpaca. Nel testicolo del ratto immunoreattività all'OxB è stata descritta negli spermatociti nello stadio di pachitene, e negli spermatidi durante le diverse fasi evolutive del loro sviluppo, da cellule rotonde ad allungate. In particolare, i citotipi positivi all'OxB sono stati evidenziati durante la seconda parte del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale cioè dal VII al XIV stadio. Inoltre, immunoreattività all'OX1R è stata descritta negli

spermatociti in zigotene e pachitene e negli spermatidi rotondi. Sempre nel testicolo di ratto l'OX2R è presente negli spermatociti in pachitene e di seconda generazione e negli spermatidi nelle varie fasi evolutive. A differenza di quanto rilevato per l'OxB, i citotipi immunopositivi all'OX2R sono stati rinvenuti lungo l'intero ciclo evolutivo dell'epitelio germinale. L'analisi dell'RT-PCR ha evidenziato l'espressione degli mRNA codificanti per i recettori OX1R ed OX2R e la presenza dei due recettori è stata garantita dalla tecnica del WB. Gli esperimenti condotti per testare la capacità steroidogenica delle orexine rivelano che l'OxA stimola effettivamente la secrezione di testosterone e la sua azione si esplica probabilmente antagonizzando quella del Müllerian Inhibiting substance, (MIS), un noto agente steroidolitico secreto dalle cellule del Sertoli. Al contrario l'OxB non sembra avere effetto sulla steroidogenesi ma rivela azione de-fosforilante sulla coppia di enzimi ERK1/2.

Per quanto concerne il testicolo dell'alpaca, immunoreattività all'OxA è stata riscontrata nelle cellule del Leydig e del Sertoli e negli spermatogoni, spermatociti in fase di preleptotene e spermatidi nelle varie fasi maturative. L'OxB è stato riscontrato negli spermatogoni, spermatociti in fase di preleptotene, zigotene e pachitene e spermatidi

rotondi ed allungati. Immunoreattività all'OX1R ed all'OX2R è stata evidenziata nelle cellule del Leydig e negli spermatidi. L'espressione della prepro-orexina, dell'OX1R e dell'OX2R è stata confermata mediante la tecnica del WB. Come nel ratto nell'alpaca espleta un effetto steroidogenico probabilmente antagonizzando quello steroidolitico del MIS.

Nell'epididimo dell'alpaca, immunoreattività all'OxA ed all'OX1R è stata riscontrata nel citoplasma delle cellule principali della testa dell'organo. La tecnica del WB ha consentito di confermare i dati immunoistochimici in quanto ha evidenziato l'espressione dei peptidi prepro-orexina ed OX1R negli omogenati tissutali. È ipotizzato che l'OxA contenuta nelle cellule principali possa regolare gli scambi ionici intercorrenti tra tali cellule ed il lume dell'organo notoriamente indispensabili per l'idratazione di quest'ultimo e quindi per la vita degli spermatozoi.

Nella prostata umana normale, iperplastica e neoplastica, l'OxA e l'OX1R sono stati rinvenuti nel citoplasma delle cellule epiteliali follicolari esocrine. L'espressione degli mRNA codificanti per la prepro-orexina e l'OX1R nonché la presenza delle relative proteine negli estratti tissutali sono state dimostrate mediante le tecniche dell'RT-PCR e del WB, rispettivamente. Allo scopo di conseguire

nuove conoscenze relative al ruolo funzionale dell'OxA nella prostata, la linea cellulare PNT1A, esprimente OX1R, è stata trattata con differenti concentrazioni di OxA allo scopo di valutare la proliferazione cellulare e le eventuali variazioni di cAMP e di Ca^{++} intracitoplasmatico. La proliferazione della linea cellulare non risulta variata ma sono stati registrati incrementi di cAMP e del rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico. Gli stessi esperimenti condotti sulla linea cellulare carcinomatosa LNCaP, esprimente anch'essa OX1R, hanno evidenziato diminuzione della proliferazione cellulare ed aumento del cAMP e del Ca^{++} citoplasmatico. Degno di nota è il risultato che l'OxA induce significativa riduzione dell'uptake intranucleare dei recettori del testosterone. I risultati ottenuti nel corso del lavoro di tesi apportano un contributo alla conoscenza della presenza del complesso orexinergico nell'apparato genitale maschile. In particolare i risultati ottenuti studiando gli effetti dell'OxA in cellule neoplastiche sembrano costituire una base di partenza per l'impiego del peptide nella terapia del cancro prostatico.

SUMMARY

The orexins A (OxA) and B (OxB) are hypothalamic peptides discovered by two independent research groups directed by Sakurai T and de Lecea L in 1998. These peptides are derived from the proteolytic cleavage of a common precursor molecule named prepro-orexin. The orexins are involved in many biological functions by binding two receptors defined receptor 1 (OX1R) and 2 (OX2R) for orexins and are localized in the central nervous system and in several peripheral organs such as adrenal glands, kidneys, gut, digestive and genital tract. The orexins regulate numerous body functions including food intake, sexual behavior, sleep/wake cycle, heart functions and neuroendocrine relations. The aim of the present work is to investigate the presence of prepro-orexin, OxA, OxB, OX1R and OX2R in some genital organs of the male genital tract in several mammalian species and in physiological and pathological conditions by means of immunohistochemistry (IHC), the western blotting (WB) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses and by using in vitro cultured and cell lines.

The organs studied in this research were the testis of rat and alpaca, the epididymis of the alpaca and the normal, hyperplastic and neoplastic prostate of men. Tissue samples were fixed in Bouin fluid

or Paraphormaldehyde for 24-48 h, processed in Paraplast and microtomically cut in order to perform IHC. Other material was frozen in liquid nitrogen at -80°C and successively used for WB and RT-PCR analyses. Tissue slices (1-2 mm thick) were collected from rat and alpaca testis and in vitro cultured for testosterone (T) detection.

OxA-, OxB-, OX1R- and OX2R- immunoreactivity (IR) were localized in many testicular cytotypes in the rat and alpaca testis. In the rat testis OxB-IR has been described in pachytene spermatocytes and in round and elongated spermatids. The OxB-IR cytotypes have been found during the second portion of the evolutive germinal cycle, from the VIIth to XIVth stages. Moreover, OX1R-IR was found in zygotene and pachytene spermatocytes and in round spermatids. In the rat testis OX2R has been localized in pachytene and second spermatocytes and spermatids, during their maturation. Differently from OxB, OX2R-IR was found during the whole developing germinal cycle. OX1R and OX2R mRNAs and proteins have been detected in tissue homogenates by means of RT-PCR and WB analysis, respectively. In vitro cultured tissue slices were added in a first experiment, with OxA or/and with Müllerian Inhibiting Substance (MIS), a steroidolytic agent produced by Sertoli cells. In the

second experiment, the steroidogenic effect of OxB has been investigated, in presence or absence of the selective antagonist of the receptor 2. OxA shows a steroidogenic effect while MIS a steroidolytic one, and, when added together to the sections, the two substances openly counteract vanishing their reciprocal effects. Moreover the immunoblotting of tissue homogenates demonstrated that OxB significantly de-phosphorylated the ERK 1/2 enzymes.

In the alpaca testis OxA-IR was found in Leydig cells, Sertoli cells, oblonged spermatogonia, resting spermatocytes and developing spermatids. OxB-IR has been described in oblonged spermatogonia, resting, zygotene and pachytene spermatocytes and in round and elongated spermatids. OX1R- and OX2R-IR was found in Leydig cells and spermatids. The expression of prepro-orexin, OX1R and OX2R was demonstrated by means of WB analysis which confirmed the immunohistochemical data. As in the rat also in this species, the in vitro tests demonstrated an OxA-induced steroidogenic effect and an antagonist action between this peptide and MIS.

In the alpaca epididymis, OxA- and OX1R- IR was detected in the principal cells of the head of epididymis. The WB analysis confirmed the immunohistochemical data and showed the expression of prepro-orexin and OX1R in this organ. In analogy with what described in the

rat epididymis for the peptides calcitonin gene-related peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and secretin, OxA could be involved in ionic exchange between the principal cells and the intraluminal environment, essential for hydration of this latter and for spermatozoa maturation and motility.

In the normal, hyperplastic and neoplastic prostate of humans, OxA- and OX1R-IR has been described in the cytoplasm of follicular epithelial exocrine cells. Prepro-orexin and OX1R mRNAs and the relative proteins have been demonstrated in tissue extracts by means of RT-PCR and WB techniques, respectively. In order to give further insights to the knowledge of the role played by OxA in the normal prostate, the cell line PNT1A, expressing OX1R gene was incubated with increasing concentrations of OxA to evaluate cell proliferation and any variations of cAMP and intracellular Ca^{++} . The proliferation of the cell line remained unaffected but cAMP and intracellular Ca^{++} release increased. The same experiments were performed on the carcinomatous cell line LNCaP, also expressing OX1R gene, and showed an inhibitory effect on cell proliferation and a cAMP and intracellular Ca^{++} release stimulation. Noteworthy, OxA induced a significative inhibition of androgen receptors nuclear traslocation.

The results obtained in this work are a contribution to the knowledge of the presence and function of the orexinergic complex in some genital organs, in health and disease. Particularly, the study of the effects of OxA on neoplastic cells could represent a starting point for the use of the peptide in treatment of prostatic cancer.

1. INTRODUZIONE

1.1. Struttura e funzione delle orexine A e B e dei recettori 1 e 2 per le orexine

I meccanismi connessi alla regolazione dell'omeostasi del corpo umano ed animale sono regolati da numerose sostanze biologiche, la cui identificazione assume notevole importanza non solo per quanto concerne l'aspetto fisiologico ad esse connesso ma anche per un eventuale loro impiego sotto il profilo terapeutico. Tra queste sostanze, le orexine A (OxA) e B (OxB) stanno suscitando attualmente crescente interesse nel panorama scientifico. Le orexine furono scoperte nel 1998 da due gruppi di ricerca indipendenti. Il primo gruppo coordinato da de Lecea L., identificò nell'ipotalamo di ratto l'RNA messaggero (mRNA) di due peptidi, aventi sequenza aminoacidica simile alla secretina intestinale, per cui furono soprannominati rispettivamente ipocretina 1 e ipocretina 2. Il secondo gruppo, coordinato da Sakurai T., individuò l'OxA e l'OxB, nell'ipotalamo della stessa specie, quali ligandi endogeni di due recettori accoppiati alle proteine G. I peptidi ipocretina1/2 e orexina A/B risultarono, in seguito, identici (Matsuki e Sakurai, 2008) e per tale ragione i due termini, attribuiti a tali peptidi vengono utilizzati

come sinonimi. Da un punto di vista etimologico, il termine orexina, deriva dal greco “ορεκτέος” che significa “inducente l’appetito”, in quanto la somministrazione a livello centrale di orexine si dimostrò responsabile dell’incremento dell’assunzione di cibo nei ratti (Sakurai et al., 1998).

L’OxA e l’OxB derivano dal taglio proteolitico post-trascrizionale di un precursore comune, la prepro-orexina, una proteina di 130 amminoacidi il cui gene umano, localizzato sul cromosoma 17, comprende 1432 coppie di basi ed è costituito da due esoni ed un introne (Taheri e Bloom, 2001) di cui la porzione essenziale per la trascrizione della prepro-orexina risulta essere costituita dalle 450 pb più prossimali (Kukkonen et al., 2002). Alterazioni del gene umano sono alla base di un gruppo di malattie neurovegetative definite “chromosome 17-linked dementiae” comprendenti il complesso di disinibizione, la demenza, il parkinsonismo e l’amiotrofia (Sakurai et al., 1998). La prepro-orexina dei mammiferi e dell’uomo è costituita da 130-131 amminoacidi (Kukkonen et al., 2002) (**Fig. 1**) la cui sequenza è ben conservata nel corso della filogenesi (75% di omologia fra le specie) ed avente elevata analogia anche con diverse specie inferiori quali lo *Xenopus laevis* (Voisin et al., 2003). In particolare, la prepro-orexina del ratto presenta un’omologia dell’83%

con quella umana e del 95% con quella murina. La mutazione dei geni codificanti per la prepro-orexina è responsabile nell'uomo di manifestazioni sintomatologiche riconducibili alla narcolessia (Peyron et al., 2000). Contrariamente a quanto accade all'uomo, l'analoga sindrome canina è caratterizzata da una mutazione del profilo genomico codificante per l'OX2R).

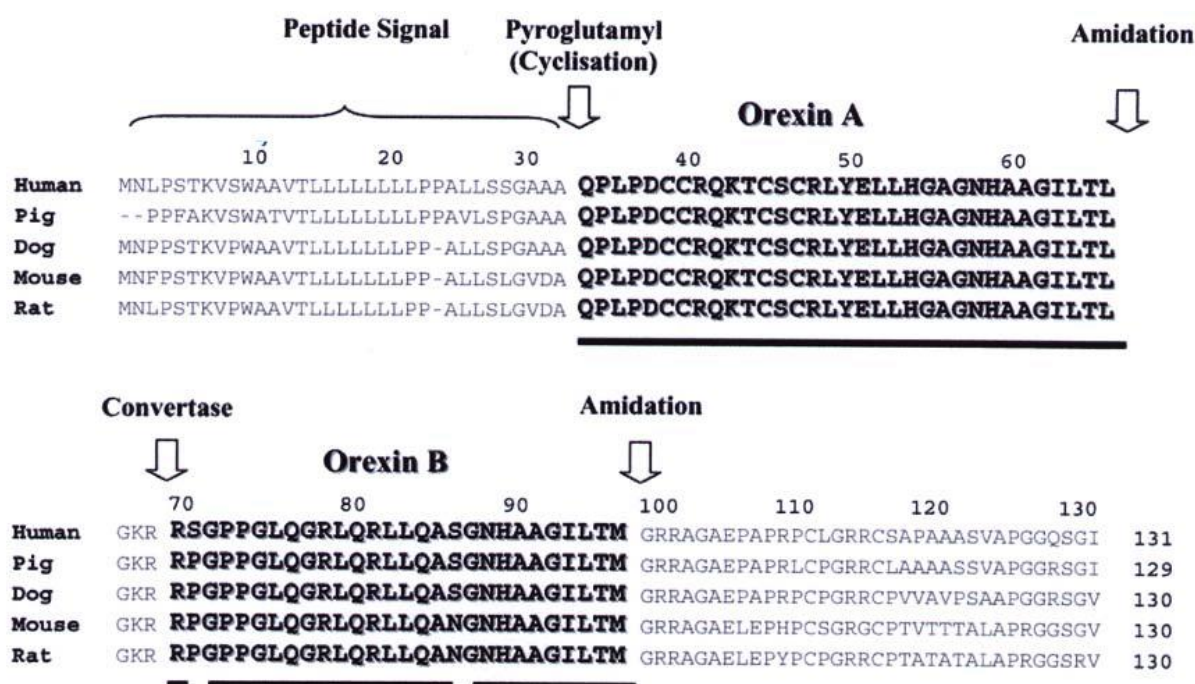


Fig. 1 Struttura della prepro-orexina e localizzazione delle sequenze aminoacidiche dell'OXA e dell'OXB in alcuni vertebrati (in grassetto). Le frecce indicano i siti di clivaggio e modificazioni chimiche, mentre gli aminoacidi sottolineati sono quelli che si conservano identici nella sequenza dei due peptidi nell'uomo, nel suino, nel cane, nel topo e nel ratto.

L'OxA è un peptide di 33 amminoacidi con un peso molecolare di 3.562 Da ed una struttura terziaria ad α -elica (Voisin et al., 2003), la cui estremità N-terminale contiene residui di acido piroglutammico e quella C-terminale risulta amidata. Essa presenta l'amminoacido

iniziale glicina ciclizzato in un residuo piroglutamico mediante un processo di transamidazione enzimatica e terminante con un residuo carbossiamidato (Sakurai et al., 1998). La sequenza amminoacidica dell'OxA umana presenta un'elevata omologia di sequenza con quella del ratto, del topo, del bovino e del suino (Taheri e Bloom, 2001) e differisce da quella dello *Xenopus laevis* (Shibahara et al., 1999) per l'assenza di 6 residui amminoacidici e per l'assenza di due amminoacidici NH₂ terminali (Kukkonen et al., 2002) (**Fig.2**). La sequenza amminoacidica dell'OxB nel topo è identica a quella del ratto (Sakurai et al., 1998), mentre quella umana differisce da quella del ratto e del topo per 2 residui amminoacidici; essa inoltre differisce per un residuo amminoacidico rispetto a quella del cane e del suino e per 7 residui amminoacidici rispetto allo *Xenopus laevis* (Kukkonen et al., 2002). L'OxA appare maggiormente stabile rispetto all'OxB per la presenza nella propria struttura di due ponti disolfuro derivanti da quattro residui cisteinici, in particolare Cys 6-12 e Cys 7-14 (**Fig.3**).

human/rat/mouse/pig/dog/bovine orexin-A qplpdccrqkctscrlyellhgagnhaagiltl
 xenopus orexin-A apdccrqkctscrlydillrgtgnhaagiltl

Fig. 2 Sequenza aminoacidica dell'OXA in diverse specie animali: uomo, ratto, topo, suino, cane, bovino e *Xenopus laevis*. Sono evidenziati, in grigio, gli aminoacidi differenti tra le varie specie.

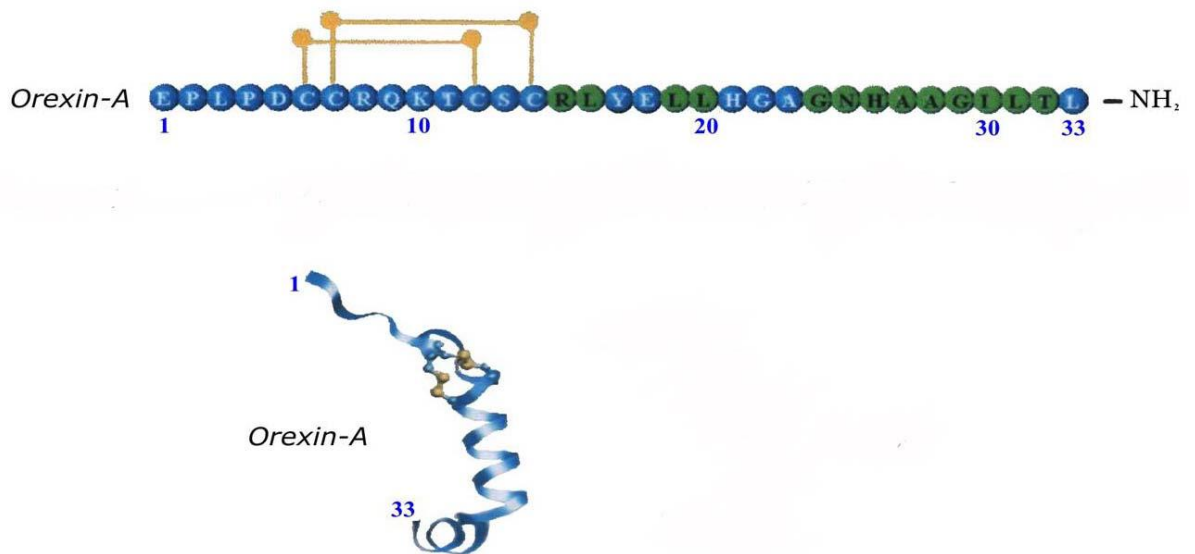


Fig. 3 Sequenza lineare e struttura terziaria dell'OXA.

L'OxA risulta essere lipofila e tale requisito le consente di oltrepassare la barriera ematoencefalica e di raggiungere elevate concentrazioni nel liquido cefalo rachidiano (Kukkonen et al., 2002). Bingham e collaboratori (2001) non hanno riscontrato passaggio intravenoso a livello cerebrale dell'OxA nel topo e nel ratto. Una ridotta quantità intravenosa è stata, invece, rinvenuta in una cane affetto da narcolessia sporadica e trattato con orexina (Fujki et al., 2003).

L'OxB è un peptide lineare di 28 amminoacidi avente un peso molecolare di 2.937 Da, con l'estremità C-terminale amidata e struttura terziaria ad α -elica (Voisin et al., 2003) (**Fig.4**). Le sequenze dell'OxA e dell'OxB dei pesci, dello *Xenopus* e del pollo presentano un alto grado di omologia con quelle dei mammiferi (Shibahara et al., 1999; Sakurai et al., 2005) (**Fig.5**). Le orexine mostrano, inoltre, un'omologia strutturale con il glucagone, il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e peptidi della famiglia della secretina (Sakurai et al., 1998). L'OxA e l'OxB presentano un'omologia di sequenza del 46% (**Fig.6**).

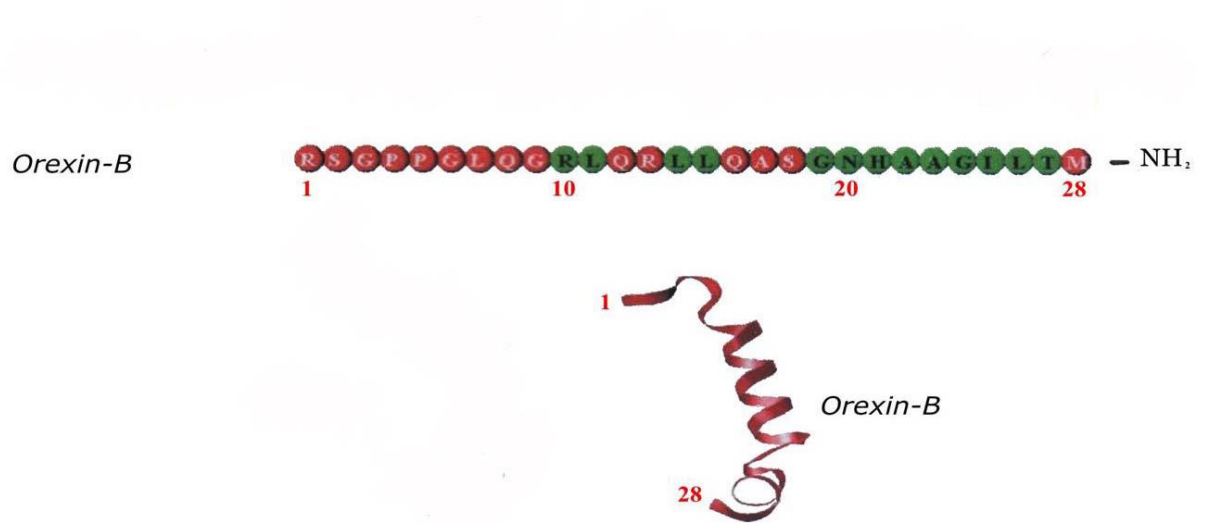


Fig. 4 Sequenza lineare e struttura terziaria dell'OXB.

human orexin-B	rsgppglqgrlqrrllqasgnhaagiltm
pig/dog orexin-B	rp ^g ppglqgrlqrrllqasgnhaagiltm
mouse/rat orexin-B	rp ^g ppglqgrlqrrllq ^a gnhaagiltm
Xenopus orexin-B	rs ^d f ^q t ^m ^s rlqrrllq ^g sgnhaagiltm

Fig. 5 Sequenza aminoacidica dell'OXB in diverse specie animali: uomo, ratto, topo, suino, cane, Xenopus laevis. In grigio, sono evidenziati gli aminoacidi diversi tra le varie specie.



Fig. 6 Sovrapposizione delle strutture tridimensionali dell'OXA (in blu) e dell'OXB (in rosso).

Entrambi i peptidi presentano una porzione simile responsabile del legame con l'OX2R, da cui l'analogia di legame per il recettore mentre la porzione dissimile è responsabile del legame con l'OX1R che è, come su detto, superiore per l'OxA rispetto all'OxB (Sakurai et al., 1998). Ammoun e collaboratori (2003) avvalorarono tale ipotesi eseguendo uno studio in vitro su cellule ovariche di Hamster cinese (CHO) da cui trassero la seguente conclusione: l'alterazione della sequenza amminoacidica dell'OxA è responsabile di una riduzione di

affinità di quest'ultimo per l'OX1R, mentre l'affinità per l'OX2R resta pressochè invariata. L'OxA e l'OxB presentano una porzione COOH terminale più importante rispetto a quella NH₂ (Darker et al., 2001). Sakurai identificò il sistema orexinergico nell'ipotalamo laterale e posteriore, le aree cerebrali deputate alla regolazione dell'appetito e dell'omeostasi energetica. Somministrazioni intra-cerebro-ventricolari (ICV) di OxA nei ratti provocano una stimolazione dose-dipendente dell'assunzione di cibo, mentre gli effetti conseguenti alla somministrazione di OxB appaiono meno significativi. L'effetto inibente l'assunzione di cibo nei ratti, previo periodo di digiuno protratto, è stato evidenziato successivamente alla somministrazione per via ICV di anticorpi anti-OxA (Yamada et al., 2000) e la somministrazione intra-peritoneale (IP) dell'antagonista del recettore 1 dell' OxA, noto come SB-334867 (Rodgers et al., 2001).

Nei mammiferi sono stati identificati due tipi di recettori per le orexine, entrambi appartenenti alla sottoclasse A delle proteine citoplasmatiche che sono accoppiati alle proteine G (G coupled receptors) e sono denominati rispettivamente recettore 1 (OX1R) e 2 (OX2R) (Sakurai et al., 1998; Trivedi et al., 1998, Sakurai et al., 2005; Kukkonen et al., 2002). OX1R è accoppiato esclusivamente alla sottoclasse G_q delle proteine G (Zhu et al., 2003) e consta di 425

residui amminoacidici (**Fig.7**). Esso è codificato da 6 esoni (Peyron et al., 2000) ed il gene che codifica per esso è collocato sul cromosoma 1p33 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Mazzocchi et al., 2001). A differenza del precedente, l'OX2R è accoppiato sia alla sottoclasse Gq che a quella Gi/o (Zhu et al., 2003). Esso consta di 444 residui amminoacidici, è codificato da 7 esoni (Peyron et al., 2000) (**Fig.8**) ed il gene che codifica per esso è localizzato sul cromosoma 6p11-q11 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Mazzocchi et al., 2001). I recettori OX1R e OX2R mostrano un'omologia di sequenza pari al 64% (Voisin et al., 2003) e sono altamente conservati nel corso della filogenesi (**Fig.9**) (Sakurai et al., 1998; Kukkonen et al., 2002; Zhang et al., 2005). L'OX1R e l'OX2R del ratto e dell'uomo presentano rispettivamente il 94% ed il 95% di omologia di sequenza (Sakurai et al., 1998). Tali recettori presentano l'estremità C-terminale a livello intracitoplasmatico (**Fig.10**), comuni siti di glicosilazione e di fosforilazione per la protein kinasi A e 3 siti comuni di fosforilazione per la protein kinasi C (Spinazzi et al., 2006).

OX₁

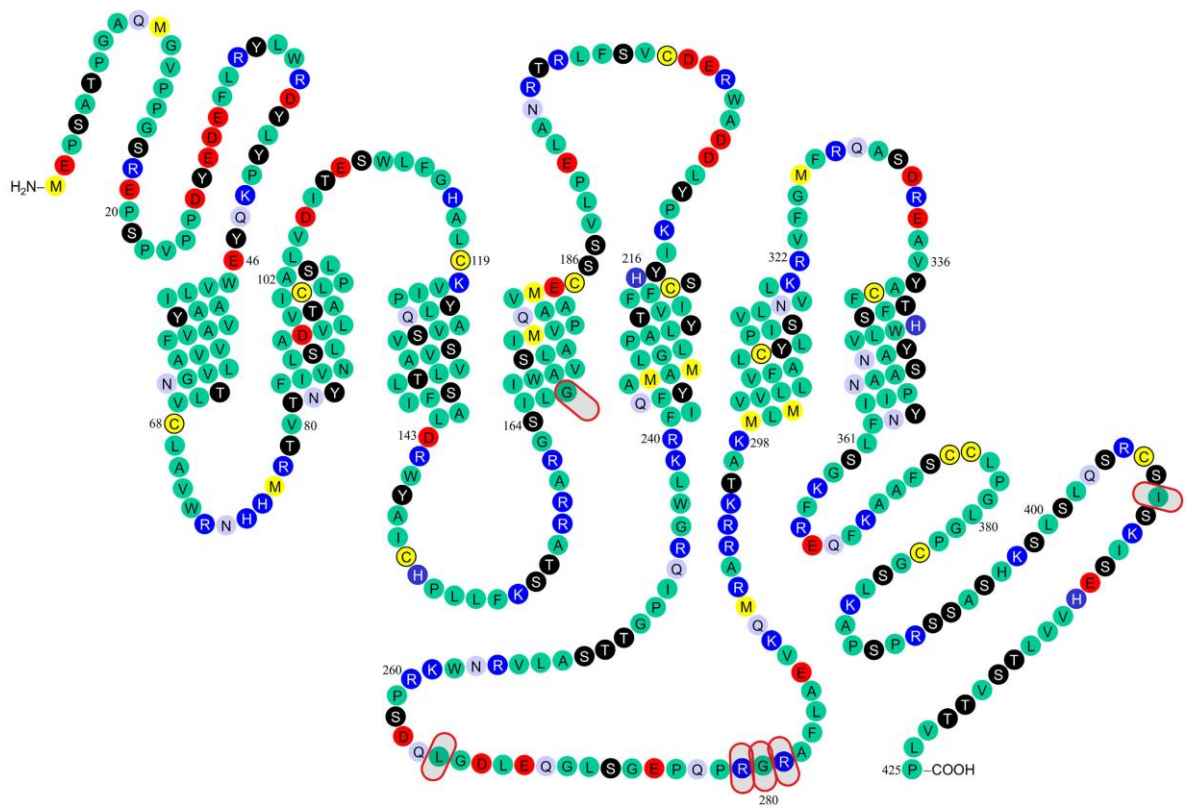


Fig. 7 Sequenza aminoacidica dell'OX₁R nell'uomo

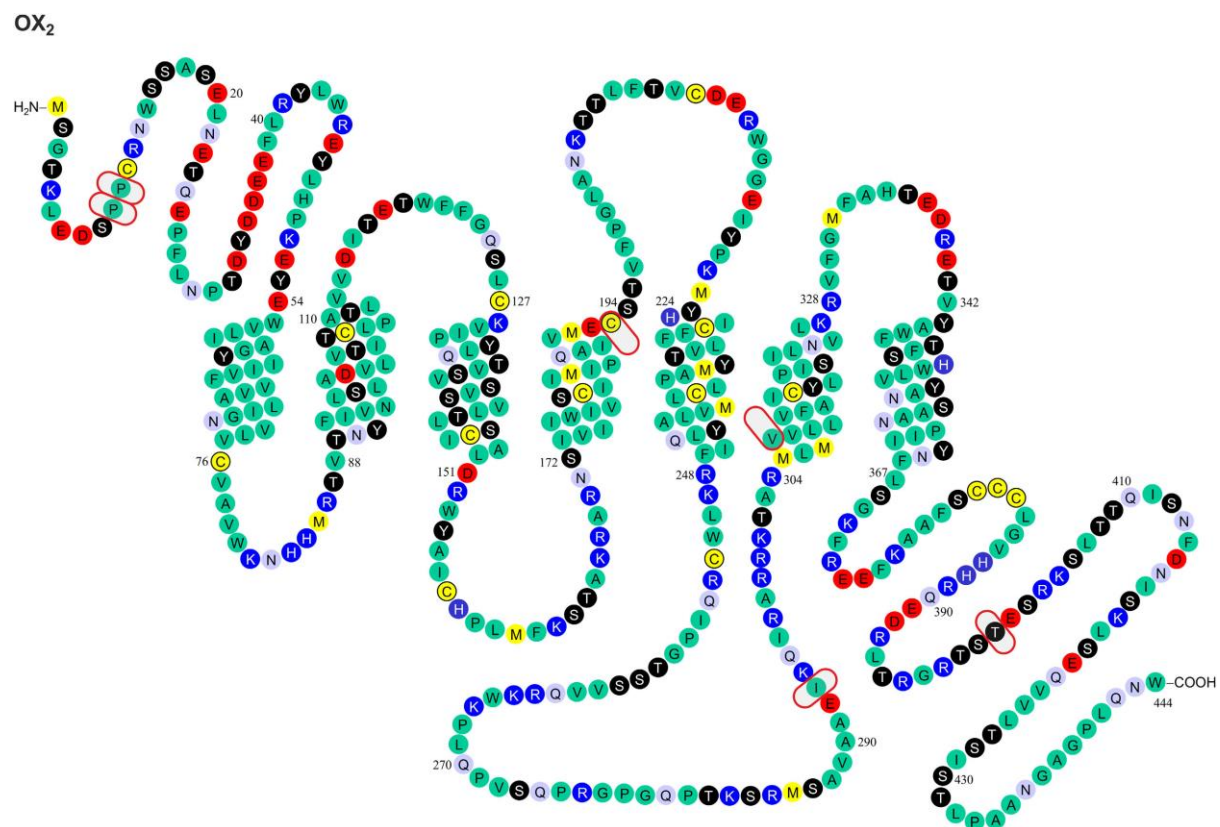


Fig. 8 Sequenza aminoacidica dell'OX₂R nell'uomo

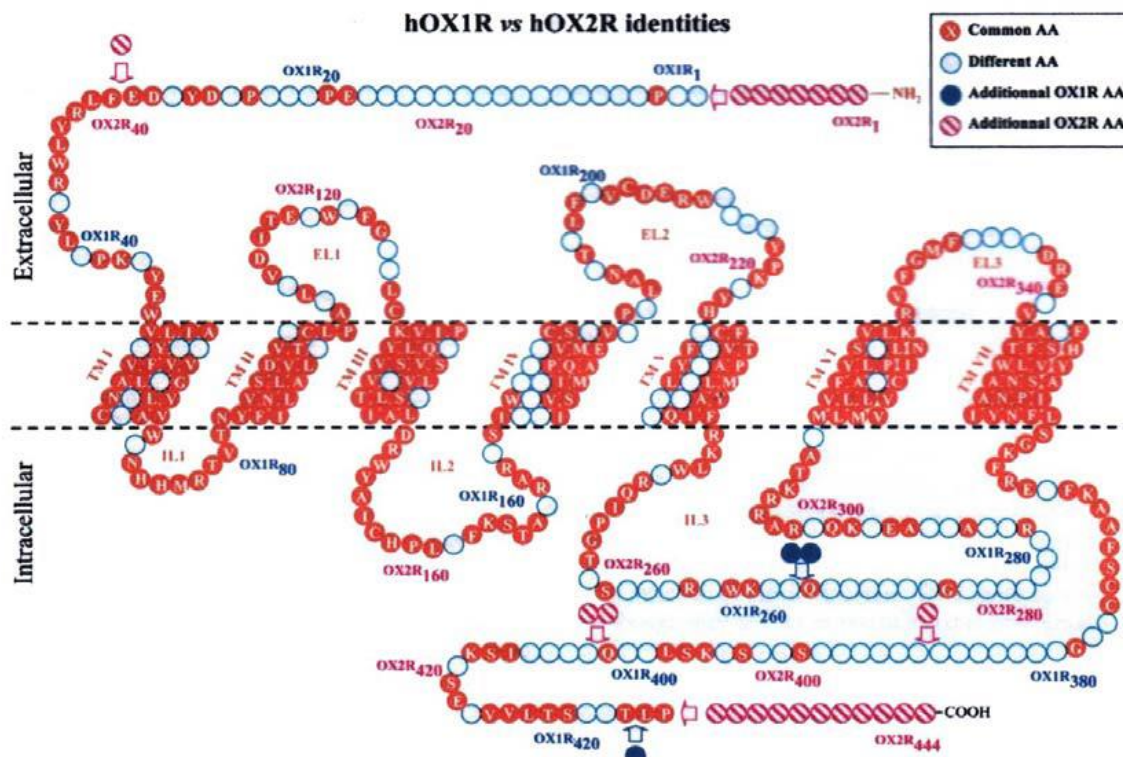


Fig. 9 Sovrapposizione della struttura secondaria dei due recettori. Gli aminoacidi cerchiati in rosso sono identici per entrambi, quelli con il cerchio blu vuoto corrispondono a quelli differenti. Con il cerchio blu pieno si identificano gli aminoacidi specifici per l'OX1R, quelli per l'OX2R sono indicati con il cerchio rosso a righe trasversali.

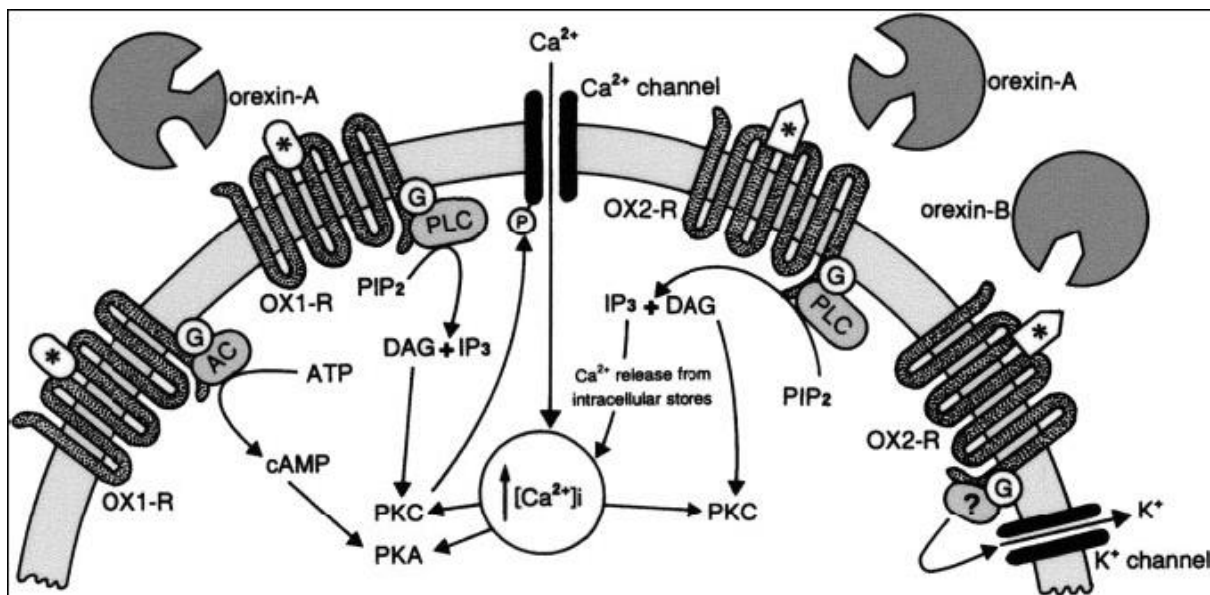


Fig. 10 Rappresentazione schematica dei principali processi di trasduzione attivati dall'interazione dell'OXA e dell'OXB con i rispettivi recettori. Abbreviazioni: G= proteina G; P= sito di fosforilazione; PKC= protein chinasi C; PKA= protein chinasi A; IP₃= inositolo trifosfato; PLC= fosfolipasi C; PIP₂= fosfatidilinositolo bifosfato; DAG= diacilglicerolo.

Studi condotti sul topo hanno dimostrato che il cDNA di OX1R codifica per una proteina di 416 amminoacidi, mentre esistono due varianti da “splicing” alternativo per OX2R: OX2 α R (443 amminoacidi) e OX2 β R (460 amminoacidi) (Chen et al., 2004). Tali isoforme presentano due differenti meccanismi di azione, infatti in

caso di privazione dell'alimento si osserva un aumento dell'espressione genica soltanto dell' mOX2 β R ipotalamico e non della variante α o dell'OX1R (Chen e Randeva, 2004) e nel tessuto scheletrico e nel rene è stato localizzato soltanto l'mOX2 α R. Alcune varianti nella sequenza dell'OX2R (ad es. 167 Gly/Ser, 265 Leu/Met etc) sono state scoperte nell'uomo e possono essere causa di mutazioni e polimorfismi (Kukkonen et al., 2002; Olafsdottir et al., 2001; Peyron et al., 2000). È stato inoltre dimostrato che alcune varianti dei genotipi (OX₁^{Val 408}, OX₂^{Ile 308}) siano correlate ad alcuni fenomeni patologici (alcune forme di emicrania, depressione ed attacchi di panico) (Meerabux et al., 2005; Rainero et al., 2008; Annerbrink et al., 2011; Rainero et al., 2011).

L'azione biologica delle orexine è mediata, come sopra menzionato, dal legame con i due recettori ed i meccanismi di azione variano a seconda della tipologia cellulare. Molti studi hanno rivelato che l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) mediata dai recettori per le orexine, è associata ad alcuni fenomeni biologici (Holmqvist et al., 2001; Johansson et al., 2007; Johansson et al., 2008; Karteris e Randeva, 2004; Karteris et al., 2005; Lund et al., 2000; Mazzocchi et al., 2001; Randeva et al., 2001) quali il rilascio di Ca⁺⁺ (Holmqvist et al., 2001; Lund et al., 2000). Nelle cellule ovariche di criceto cinese

(CHO) l'attivazione di entrambi i recettori incrementa la stimolazione diretta della PLC e la concentrazione di calcio intracellulare (Lund et al., 2000). L'incremento del Ca^{++} intracellulare avviene sia in colture cellulari esprimenti all'origine i recettori sia in quelle in cui tali recettori sono stati trasfettati. Tale incremento di Ca^{++} è regolato da due differenti meccanismi uno dei quali è caratterizzato dall'attivazione dell'inositolo trifosfato (IP3) citoplasmatico (Voisin et al., 2003). Le orexine presentano un effetto di stimolazione delle cellule nervose, associato sia a meccanismi pre-sinaptici che post-sinaptici. In particolare, l'azione neuroeccitatoria è associata all'inibizione dei canali per il K a livello post-sinaptico (Mark e Herlitze, 2000). Entrambe le orexine inducono il rilascio di noradrenalina da porzioni cerebrocorticali di ratto, parzialmente dipendente dal Ca^{++} extracellulare (Hirota et al., 2001). Nei topi l'attivazione dei recettori orexinergici induce il turn-over dell'IP3 (Kukkonen et al., 2001).

I recettori per le orexine inoltre, attivano le vie enzimatiche dell'extracellular signal-regulated kinase (ERK) e del p38 in cellule ricombinanti (Ammoun et al., 2006; Hilaiet et al., 2003; Kukkonen et al., 2002; Tag et al., 2008) ed in diverse linee cellulari (Ramanajeneya et al., 2009; Sellayah et al., 2011). Ad esempio, in cellule

adrenocorticali di ratto, la cascata enzimatica dell'ERK è alla base della stimolazione della divisione cellulare mediata dall'azione dell'orexina, mentre la p38 inibisce tale fenomeno (Spinazzi et al., 2005). La stimolazione dei recettori per le orexine può inoltre, indurre apoptosi come accade nelle cellule CHO ricombinanti, nelle linee cellulari di carcinoma del colon e di neuroblastoma (Ammoun et al., 2003; Ammoun et al., 2006; Rouet-Benzineb et al., 2004; Voisin et al., 2006; Voisin et al., 2011). Nelle cellule CHO ricombinanti esprimenti l'OX1R, l'attivazione di p38 sembra avere effetto apoptotico, mentre quella dell'ERK, effetto anti-apoptotico (Ammoun et al., 2006).

1.2. Espressione e funzione delle orexine e dei loro recettori nel sistema nervoso centrale

Le orexine ed i loro recettori sono stati identificati nell'ipotalamo di molti mammiferi (**Fig.11**) (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Trivedi et al., 1998; Lu et al., 2000; Greco e Shiromani, 2001; Hervieu et al., 2001; Marcus et al., 2001). In particolare, nel cervello di ratto, l'mRNA per la prepro-orexina e immunoreattività alle orexine sono stati rinvenuti in distinte popolazioni di neuroni

nell'ipotalamo laterale, dorsale e perifornicale proiettanti i loro assoni in differenti nuclei ipotalamici (de Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Chen et al., 1999; Cutler et al., 1999; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999; Taheri et al., 1999; Briski e Sylvester, 2001; Fadel e Deutch, 2002; Cheng et al., 2003), nell'area preottica mediale (Date et al., 1999; Kohsaka et al., 2001) e nell'eminenza mediana (Chen et al., 1999; Russell et al., 2001; Cheng et al., 2003).

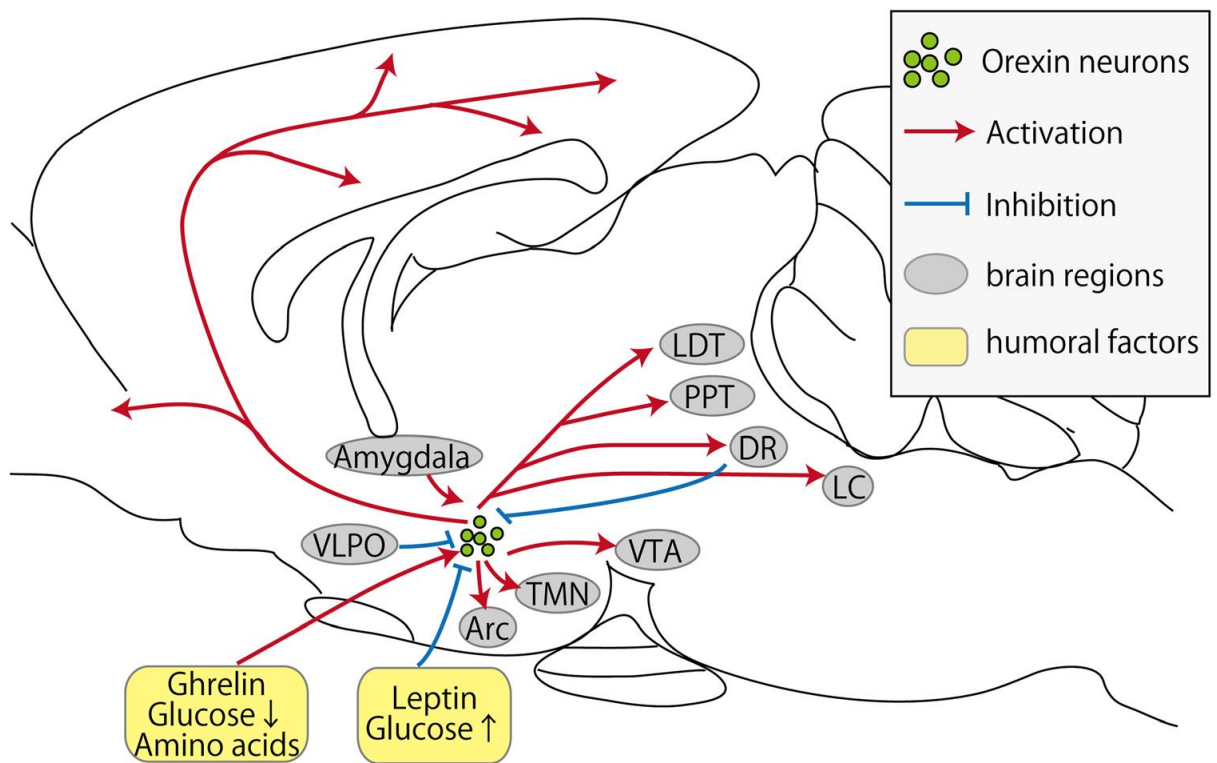


Fig. 11 Rappresentazione schematica di inputs ed outputs di neuroni orexinergici. Le frecce rosse indicano le proiezioni a carattere eccitatorio, mentre quelle blu a carattere inibitorio. Abbreviazioni: Arc, nucleo arcuato; DR, nucleo del rafe dorsale; LC, locus coeruleus; LDT, nucleo tegmentale laterodorsale; PPT, nucleo peduncolopontino tegmentale; VTA, area tegmentale ventrale; VLPO, nucleo preoptico ventrolaterale.

Le orexine inviano estese proiezioni extra-ipotalamiche nella corteccia cerebrale, ippocampo, amigdala, nuclei mediali talamici, periacquedotto grigio, nuclei del raphe, area segmentale ventrale, locus coeruleus (LC), area postrema, nuclei del tratto solitario ed il midollo spinale (Horvath et al., 1999; Moore et al., 2001).

Per quanto concerne l'azione dell'OxA, essa sembra stimolare in vitro la secrezione dell'ormone della crescita (GH) (Chen et al., 2003; Xu et al., 2002; Xu et al., 2003) e regolare in vivo la produzione di GH (Lopez et al., 2004; Seoane et al., 2004). Backberg e collaboratori (2002) hanno dimostrato la presenza di immunopositività all'OxA in neuroni contenenti VIP (nuclei soprachiasmatici), somatostatina (nuclei periventricolari), vasopressina ed ossitocina (nucleo supraottico), neuropeptide Y (NPY), pro-opiomelanocortina (POMC) ed anfetamine (ipotalamo ventrolaterale), melanina ed istamina (nuclei tuberomammillari) (TMN). Neuroni orexinergici mostrano immunoreattività al recettore della leptina nell'ipotalamo laterale (Hakansson et al., 1999).

L'OX1R è ampiamente espresso nei nuclei arcuati, soprachiasmatici e ventromediali dell'ipotalamo, mentre il recettore OX2R è maggiormente espresso nei nuclei paraventricolari (PVN) (Russel et al., 2001). Oltre che nell'ipotalamo, l'OX1R è presente soprattutto nel

LC ed, in apprezzabili quantità, nei nuclei olfattivi, nella corteccia piriforme, nel talamo, nell'ippocampo, nei nuclei tegmentali dorsali, nei nuclei dorsali del raphe, nel midollo spinale (Hervieu et al., 2001), nel nucleo arcuato (ARC), nell'eminenza mediana (ME), nei nuclei laterali ipotalamici e nell'area preottica, lungo il terzo ventricolo dai nuclei paraventricolari a quelli ipotalamici ventromediali (VMH). Backberg e collaboratori (2002) hanno dimostrato che i neuroni dei nuclei arcuati co-localizzano OX1R ed NPY mentre i neuroni dell'ipotalamo laterale orexine ed NPY.

L'OX2R è stato rinvenuto nel VI strato della corteccia, nell'amigdala, nei nuclei mesencefalici trigeminali, nei nuclei reticolari pontini, nei nuclei cocleari ventrali (Russel et al., 2001), nei PVN, ARC, ME, VMH, in una piccola regione della superficie ventrale preottica (Zhang et al., 2005), nella corteccia cerebrale, nel nucleo accumbens, nel nucleo subtalamico e nei nuclei paraventricolari del talamo e di quello anteriore pretettale.

L'OX1R sembra essere maggiormente espresso rispetto all'OX2R nell'adenoipofisi (Date et al., 2000), ed ambo i peptidi sono stati riscontrati anche nel lobo intermedio e nella neuroipofisi. L'OX1R è presente nelle cellule acidofile dell'adenoipofisi mentre l'OX2R è

presente nelle cellule basofile co-esprimenti l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Blanco et al., 2001).

Nell'epifisi è stato rinvenuto esclusivamente l'mRNA codificante per l'OX2R non quello codificante per l'OX1R (Mikkelsen et al., 2001). Alcuni studi hanno messo in correlazione i livelli di mRNA dell'Ox1R ipotalamici con le fasi del ciclo estrale in femmine di ratto (Wang et al., 2003), dimostrando che essi aumentano durante il tardo proestro e nei primi mesi di lattazione. La presenza di mRNA sintetizzanti le orexine ed i relativi recettori è stata descritta nella ghiandola pineale e nell'ipotalamo di suino (Fabris et al., 2004) mentre quella dell'mRNA sintetizzante il recettore per le orexine del pollo (chicken orexin receptor, cOXR) risulta diffusa nell'ipotalamo degli uccelli (Ohkubo et al., 2003).

Le orexine, attraverso il legame con l'OX1R sono in grado di influenzare la secrezione di neuropeptidi ipotalamici implicati nella regolazione dell'appetito (Sakurai et al., 1998). Secondo Kukkonen e collaboratori (2002) l'OX1R può agire come autoregolatore inibitorio somato-dendritico e come recettore post-sinaptico.

Le orexine e i loro recettori essendo, quindi, presenti in varie strutture del SNC possono regolare molteplici funzioni organiche (**Fig.12**).

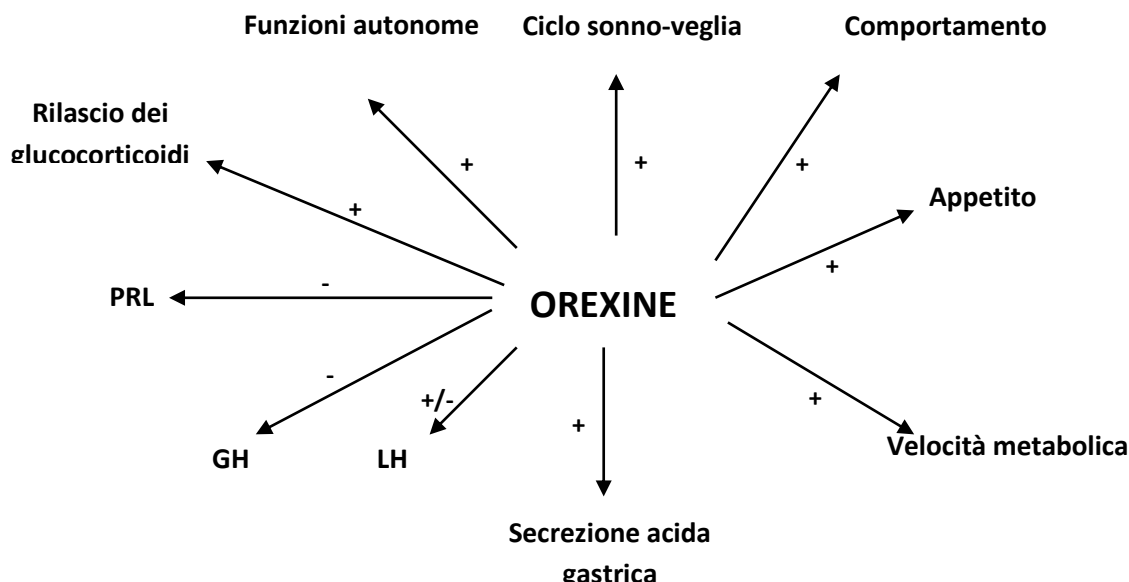


Fig. 12 Principali funzioni delle orexine in vari distretti organici

Le orexine, inoltre, sono coinvolte nella modulazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Il loro effetto si esplica sia sulla proliferazione delle cellule surrenali coltivate in vitro (Malendowicz et al., 2001; Mazzocchi et al., 2001; Spinazzi et al., 2005a) sia a livello centrale con stimolazione del rilascio di steroidi surrenalici. L'iniezione ICV di OxA determina incremento dose-dipendente di

corticosterone ed aumento dell'espressione di c-Fos nei PVN (Ida et al., 2000; Al-Barazanji et al., 2001). Nelle stesse condizioni sperimentali, l'OxB risulta meno efficace dell'OxA, tuttavia, essa influenza i livelli di corticosterone dopo somministrazione periferica (IP).

La localizzazione dei neuroni orexinergici nell'ipotalamo dorso-laterale ha suggerito un ruolo per l'OxA nei meccanismi di regolazione dell'assunzione di cibo e dell'omeostasi energetica (Sakurai et al., 1998; Date et al., 1999; Kukkonen et al., 2002). L'espressione della prepro-orexina è stimolata dal digiuno prolungato o da ipoglicemia (Griffond et al., 1999) mentre risulta diminuita in modelli animali affetti da obesità genetica (Hara et al., 2001). L'azione dell'OxA è stata associata a quella di altri peptidi responsabili della regolazione dell'assunzione di cibo, quali leptina, NPY, ormone concentrante la melanina (*MCH*), *POMC* ed altri (Kukkonen et al., 2002).

Inoltre l'OxA è coinvolta nei processi cognitivi autonomi e comportamentali (Kukkonen et al., 2002). Le orexine, in particolare l'OxA, se iniettate ICV, aumentano l'entità di risposte comportamentali indotte dalla nocicezione termica, meccanica e chimica, mentre l'iniezione periferica sottocutanea (SC) è risultata

completamente inefficace. Gli effetti dell'OxA sono inibiti dagli antagonisti dei recettori per l'adenosina e per la teofillina, ma non dal naloxone, suggerendo un possibile coinvolgimento dei neuroni contenenti adenosina. Se iniettata per via IV, l'OxA ha manifestato, anche, un effetto analgesico che non si manifesta se l'OxA è iniettata per via SC. Tale effetto è inibito da un antagonista dell'OX1R, ma non dal naloxone (Bingham et al., 2001), per cui il sistema di oppiacei non sembra essere coinvolto nell'effetto analgesico e l'OxA agisce su recettori situati nel cervello e nel midollo spinale. L'OxA, inoltre, regola il ritmo circadiano, stimolando lo stato di veglia e l'attività motoria (Mileykovskil et al., 2002). E' ampiamente documentato che l'assenza di OxA è alla base della patogenesi della narcolessia (Thannickal et al., 2000; Mignot et al., 2002). La presenza del peptide è stata riscontrata nell'urina e nel plasma umano (Arihara et al., 2001; Takahashi et al., 2006) di pazienti affetti da narcolessia (Thannickal et al., 2000). Topi knock-out per l'OxA esibiscono un fenotipo molto simile a quello dei narcolettici come avviene nel modello canino canarc-1, l'unico modello monogenico di narcolessia che esibisce una mutazione nel recettore OX2R (Chemelli et al., 1999). Le orexine, inoltre sono state riscontrate nella retina umana in cui sembrano coinvolte nella regolazione della funzione visiva. In particolar modo, sono risultate immunoreattive alle orexine, le cellule gangliari, alcuni

processi cellulari, lo strato plessiforme e la porzione interna dei fotorecettori (Savaskan et al., 2004).

L'effetto sull'assunzione degli alimenti da parte delle orexine si riduce notevolmente nei ratti anziani a causa della diminuzione dei relativi recettori (Takano et al., 2004) e non si riscontra negli uccelli (Ohkubo et al., 2003) e nei topi knockout per il gene che codifica per l'ossido nitrico sintasi (NOS) (Farr et al., 2005). Attualmente sono noti più di cinquanta fattori che agiscono sul SNC influenzando l'assunzione degli alimenti e quindi interagendo con l'azione delle orexine. Tra di esse si ricordano l'NPY, la leptina, l'ormone melanocorticotropo, il peptide regolatore del gene Agouti, la galanina, la POMC e la dinorfina (Taheri e Bloom, 2001; Ehrström et al., 2005; Kmiec, 2006). Un effetto paradossale riguardante l'assunzione degli alimenti è riportato nei topi che sovra-esprimono la prepro-orexina. Tali animali perdono progressivamente peso corporeo nonostante una accresciuta assunzione di cibo, in quanto il loro metabolismo risulta decisamente superiore alla norma (Lubkin e Sticker., 1998). In seguito alla somministrazione di OxA per via ICV o nel nucleo dorsale del vago è stata evidenziata una stimolazione della secrezione acida (Okumura et al., 2001) e della motilità dello stomaco (Hwang et

al., 2001) e un aumento della contrattilità del duodeno, digiuno ed ileo (Sato et al., 2001).

La somministrazione sottocutanea dell'OxA e dell'OxB stimola la secrezione endocrina del pancreas determinando rilascio di insulina in modo dose-dipendente (Nowak et al., 2000) e la somministrazione ICV di OxA aumenta la secrezione esocrina della ghiandola probabilmente mediante stimolazione vagale (Miyasaka et al., 2002).

Le orexine sono implicate anche nel meccanismo che regola l'assunzione dell'acqua (Kunii et al., 1999).

L'OxA induce alcuni comportamenti tipicamente materni quali il grooming, il licking e la durata della lattazione (D'Anna e Gamme, 2006). La somministrazione dell'OxA nell'area preottica mediale dell'encefalo di ratti maschi provoca l'aumento delle performances sessuali (Gulia et al., 2002). Si osserva un aumento dose-dipendente dell'attivazione dei neuroni dopaminergici che sono notoriamente coinvolti nella trasmissione degli impulsi nervosi durante il rituale dell'accoppiamento nel maschio (Muschamp et al., 2007).

1.3. Il complesso orexinergico negli organi periferici

Le orexine ed i loro recettori sono stati rinvenuti non solo nel SNC ma anche nella componente nervosa e non, di molti organi periferici dei mammiferi (Shibahara et al., 1999; Mercer et al., 2001; Blanco et al., 2003). I neuroni orexinergici ed i recettori per le orexine sono presenti in ramificazioni del nervo vago nel testicolo, nelle ghiandole surrenali, nei reni e nella placenta (Jöhren et al., 2001; Nakabayashi et al., 2003; Barreiro et al., 2005; Takahashi et al., 2006). L'OxA ed i recettori 1 e 2 si trovano nei plessi nervosi sottomucoso e mienterico del piccolo intestino, nelle cellule eso-endocrine del pancreas e nelle cellule endocrine dello stomaco e dell'intestino tenue (Kirchgessner et al., 1999). In particolare l'OxA è stata riscontrata nelle cellule β del pancreas (Kirchgessner et al., 2002; Ehrström et al., 2005). La presenza di recettori per l'OxA è stata rinvenuta in diverse strutture nervose dell'apparato gastroenterico nell'uomo e nel ratto (Burdyga et al., 2003). L'immunoreattività all'OX1R è stata evidenziata in fibre nervose gangliari, nella muscolatura liscia e nella mucosa di tale apparato (Ehrström et al., 2005). Per quanto riguarda lo stomaco, l'immunoreattività all'OxA ed all'OX1R è stata evidenziata nella mucosa, in fibre e corpi cellulari mienterici e nella muscolatura circolare (Ehrström et al., 2005). Altri studi hanno consentito di

mostrare una co-localizzazione nei neuroni tra orexine ed acetilcolina ed un sottoinsieme di questi neuroni esprime inoltre il VIP. Le cellule enterocromaffini del digerente contengono OxA ed esprimono l'OX2R, mentre l'OX1R è espresso in numerose strutture neuronali dell'intestino (Naslund et al., 2002). A livello intestinale, è stata riscontrata la presenza dell'OX1R, ma non dell'OX2R, in cellule tumorali di colon umano, HT29-D4. L'OxA è stata evidenziata precocemente nelle cellule endocrine dell'antro pilorico di embrioni murini dal 14° giorno di sviluppo, mentre essa si palesa a livello intestinale a partire dal 15° giorno (Sanchez de Miguel e Burrel, 2002).

L'OxA sembra svolgere un ruolo preponderante nella funzionalità della ghiandola surrenale. La presenza dei recettori per le orexine è stata segnalata nella ghiandola dell'uomo, ratto, bovino, ovino e pollo (Lopez et al., 1999; Randeva et al., 2001; Kawada et al., 2003; Okhubo et al., 2003; Zhang et al., 2005). Studi recenti hanno dimostrato che la molecola stimola la secrezione di glucocorticoidi nelle cellule della corteccia surrenale dell'uomo e del ratto, agendo esclusivamente attraverso il recettore OX1R (Ziolkowska et al., 2005). Altri studi hanno confermato la presenza dell'OX1R e dell'OX2R, e dei loro rispettivi mRNA, nella corteccia e nel midollo

delle ghiandole surrenali (Malendowicz et al., 2001; Mazzocchi et al., 2001; Randeva et al., 2001; Spinazzi et al., 2005b). Inoltre, l'espressione di ambo i recettori sembra essere superiore negli adenomi della ghiandola rispetto alle condizioni fisiologiche (Spinazzi et al., 2005b). Nelle ghiandole surrenali dei ratti maschi i livelli di mRNA codificante per l'OX2R risultano essere 4 volte superiori a quelli riscontrati a livello cerebrale ed in particolare l'mRNA codificante per l'OX2R è stato rinvenuto nella zona glomerulare e reticolare.

Altri dati bibliografici hanno confermato che l'OX1R è espresso nella zona corticale della ghiandola surrenale umana in condizioni fisiologiche, mentre l'OX2R si trova principalmente in quella midollare (cellule adrenergiche e noradrenergiche) (Spinazzi et al., 2005b). Esperimenti di doppia marcatura in immunofluorescenza hanno dimostrato che tutte le cellule midollari, le cellule adrenergiche e noradrenergiche, esprimono l'OX2R (Blanco et al., 2002). Alcune neoplasie corticali (adenomi corticosurrenali) sono risultati positivi all'OX1R, ma non all'OX2R; un tumore midollare (feocromocitoma), invece, esprime esclusivamente l'OX2R (Blanco et al., 2002). Le orexine sono coinvolte nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene agendo a livello centrale, ipofisario e surrenalico. La

somministrazione ICV di OxA incrementa nel ratto, i livelli plasmatici del cortisone, del corticosterone e dell'ACTH (Russell et al., 2001a; Date et al., 1999). Incremento del rilascio di tali ormoni steroidei avviene attraverso l'attivazione dell'adenilato ciclastasi e dell'IP3 (Randeva et al., 2001) in colture cellulari adrenocorticali umane e di ratto. Inoltre, in colture di cellule midollari di suino l'OxA stimola il rilascio di epinefrina e norepinefrina (Voisin et al., 2003) mentre in colture di cellule adrenergiche bovine si osserva un aumento del rilascio delle C-catecolamine soltanto se è disponibile come substrato la C-tirosina, in quanto sembra che l'OxA attivi la tirosina idrossilasi mediante l'azione di una protein chinasi C-dipendente (Kawada et al., 2003).

Un particolare quadro fenotipico è quello riscontrato in topi nei quali è stato transfettato il gene ataxina 3, che è alla base dell'alterazione dei precursori delle orexine con conseguente perdita dei neuroni orexinergici che a sua volta causa assenza dell'ormone rilasciante l'ormone corticotropo. La sintomatologia manifestata è caratterizzata dall'alterazione del ritmo circadiano, cataplessia, riduzione dell'attività motoria e dell'appetito, non associata quest'ultima a perdita di peso corporeo bensì ad obesità (Hara et al., 2001). Tale quadro patologico è sovrapponibile a quello osservato negli uomini

affetti dalla cosiddetta “sindrome di Cushing” caratterizzata, fra l’altro, da un eccesso di cortisolo circolante (Ferguson e Samson, 2003).

La somministrazione ICV dell’OxA inibisce inoltre il rilascio di prolattina (Russell et al., 2000) e riduce la secrezione basale dell’ormone della crescita, senza alterare la quantità dell’ormone rilasciante l’ormone della crescita (Lopez et al., 2004). La somministrazione per via endovenosa di OxA aumenta il tasso dell’ormone rilasciante la tireotropina e diminuisce i livelli plasmatici di quest’ultima (Kukkonen et al., 2002; Martyńska et al., 2006).

Negli ovini è stata evidenziata la presenza dell’mRNA per l’OX1R nella ghiandola surrenale, nel rene e nel testicolo (Zhang et al., 2005).

Inoltre, immunopositività all’OxA è stata riscontrata nei tubuli renali dell’uomo e la presenza del peptide è stata rilevata anche nelle urine di maschi adulti mediante test radioimmunologico (Takahashi et al., 2006). L’OxA è normalmente presente nella circolazione sanguigna sistemica dell’uomo e del ratto (Jöhren et al., 2001; Voisin et al., 2003). I recettori per le orexine, infine, sono stati evidenziati mediante la tecnica di immunoistochimica, nelle cellule di Merkel cutanee e nelle vibrisse del suino (Beiras-Fernandez et al., 2004).

1.4. Espressione e funzione delle orexine nell'apparato genitale

Le orexine sono state studiate nell'apparato genitale maschile e femminile di alcuni mammiferi. Alcuni anni dopo è stata dimostrata la presenza dell'OxA (Mitsuma et al., 2000a), degli mRNA codificanti per l'OX1R, per l'OX2R (Jöhren et al., 2001; Karteris et al., 2004) e per la prepro-orexina (Barreiro et al., 2005) nell'apparato genitale maschile. Nell'uomo è stato individuato l'mRNA per la prepro-orexina nell'epididimo e nel pene (Karteris et al., 2004), mentre gli mRNA per entrambi i recettori sono stati ritrovati nel testicolo, nell'epididimo, nel pene e nelle vescicole seminali. Nella gonade, in particolare, è stata rinvenuta presenza di OX1R nelle cellule del Sertoli, del Leydig e mioidi peritubulari mediante una tecnica di immunofluorescenza (Karteris et al., 2004). La presenza dell'OxA e dell'OxB è stata evidenziata mediante radioimmunoassay nel testicolo del ratto (Mitsuma et al., 2000a; Mitsuma et al., 2000b). L'mRNA codificante per l'OX1R è stato evidenziato nella gonade maschile dell'ovino e del pollo (Ohkubo et al., 2003; Zhang et al., 2005) ed in concentrazioni ridotte nella gonade femminile del pollo e del ratto (Jöhren et al., 2001; Ohkubo et al., 2003).

Il testicolo del ratto rappresenta l'organo genitale maggiormente studiato in relazione all'OxA ed ai relativi recettori. In particolare, l'espressione di recettori per l'OxA in cellule di Leydig umane suggerisce un ruolo svolto dal peptide nella steroidogenesi (Barreiro et al., 2004; Karteris et al., 2004). Il peptide incrementa, infatti, in modo dose-dipendente, la secrezione basale di testosterone (T) da parte delle cellule del Leydig sia in vivo, successivamente ad iniezione intratesticolare, sia in vitro su sezioni tissutali incubate (Barreiro et al., 2004). La fonte di produzione dell'OxA è probabilmente rappresentata dalle cellule del Sertoli, in quanto dopo distruzione selettiva delle cellule del Leydig, i livelli di mRNA codificante per la prepro-orexina persistono in gran parte (Barreiro et al., 2005). Immunoreattività all'OxA è stata riscontrata negli spermatociti in fase di preleptotene, leptotene, zigotene e pachitene (Barreiro et al., 2005). Studi successivi a quelli di Barreiro e collaboratori, hanno riguardato l'evidenziamento dell'OxA e dell'OX1R nel testicolo e nell'epididimo del ratto. Tafuri e collaboratori (2010) hanno rilevato immunoreattività all'OxA nelle cellule del Sertoli e negli spermatidi nelle varie fasi maturative (da rotondi ad allungati). La presenza di spermatidi immunopositivi è stata riscontrata dal VII al XIV stadio del ciclo maturativo dell'epitelio germinale. L'OxA e l'OX1R presentano localizzazione

apicale nelle cellule principali della coda dell'epididimo (Tafari et al., 2009).

L'espressione dell'OxA e del suo recettore 1 è stata riscontrata nel complesso uretro-prostatico del bovino. In particolare, immunopositività all'OxA era presente nelle cellule "neuroendocrine" sparse nell'epitelio uretrale mentre l'epitelio esocrino della prostata risulta essere positivo sia all'OxA che all'OX1R (Russo et al., 2008). Al contrario, Nakabayashi e collaboratori (2003) hanno negato la presenza dell'OxA nella prostata umana.

Malendowicz e collaboratori (2011) hanno evidenziato, mediante tecniche di RT-PCR e western blotting, la presenza dell'OX2R nella prostata umana normale ed iperplastica ma non l'mRNA codificante per la prepro-orexina e per l'OX1R. In sezioni di prostata normale, immunoreattività all'OX2R, inoltre, è stata riscontrata nella porzione apicale delle cellule epiteliali e nelle fibrocellule muscolari stromali mentre nella prostata iperplastica l'immunoreattività a tale peptide appare più intensa pur considerando la stessa localizzazione. L'elevata espressione dell'OX2R nell'iperplasia prostatica è associata a basse concentrazioni dell'OxA nel siero dei pazienti affetti da tale fenomeno patologico. Tali dati hanno consentito di ipotizzare che

l'OxA e l'OX2R siano probabilmente coinvolti nella patogenesi e/o nella persistenza dello stato iperplastico.

Per quanto concerne l'apparato genitale femminile, Nitkiewicz e collaboratori (2014) hanno riscontrato l'espressione dell'OxA, dell'OxB e della prepro-orexina nell'ovaio di suino. Alti livelli di prepro-orexina sono presenti nelle cellule della teca interna del follicolo ovarico intorno al 17°-19° giorno del ciclo estrale. Immunoreattività all'OxA è stata riscontrata anche nei corpi lutei. La presenza dell'mRNA codificante per l'OX1R e per l'OX2R e le relative proteine è stata evidenziata nelle gonadi femminili del ratto e del suino (Silveyra et al., 2007; Nitkiewicz et al., 2010). La quantità di trascritto di entrambi i recettori nell'ovaio del ratto varia durante il corso del ciclo estrale con un incremento nella fase di proestro. È stato ipotizzato che le gonadotropine ipofisarie possano svolgere un ruolo nel controllo dell'espressione del sistema orexinergico ovarico. Cataldi e collaboratori (2012) hanno invece dimostrato, mediante tecniche in vitro, che l'OxA è associata ad un notevole incremento dell'espressione dei recettori per le orexine nelle cellule luteali e follicolari dell'ovaio del ratto. Non è stata rilevata presenza di mRNA codificante per la prepro-orexina nelle gonadi femminili del ratto (Silveyra et al., 2007; Jöhren et al., 2001). L'assenza del trascritto

della prepro-orexina e la presenza dei recettori per le orexine nell'ovaio del ratto, autorizzano l'ipotesi che le orexine possano raggiungere le gonadi femminili mediante il circolo ematico periferico oppure che la loro attivazione locale possa essere indotta da altri ligandi. L'insieme dei dati sopra riportati inducono l'ipotesi che le orexine possano avere modalità di diffusione autocrino/paracrina nella gonade femminile.

Nitkiewicz e collaboratori (2012) hanno dimostrato l'espressione del gene codificante per la prepro-orexina e la presenza di OxA nell'utero del suino. Immunoreattività per il peptide è stata inoltre rinvenuta nelle cellule sinciziotrofoblastiche e decidue della placenta umana (Nakabayashi et al., 2003). Il ruolo funzionale dell'OxA in tale organo non è stato ancora chiarito, ma è stato ipotizzato che l'OxA possa raggiungere il feto attraverso il circolo ematico materno influenzandone la crescita. Altri studi più recenti condotti da Dall'Aglio e collaboratori (2012 e 2014) hanno evidenziato la presenza dell'OxA e dei recettori 1 e 2 per la orexine nella placenta del gatto e del cane a fine gestazione. Gli autori ipotizzano che l'OxA agisca nella placenta attraverso una modalità di diffusione autocrino/paracrina ed endocrina, contribuendo all'espletamento delle funzioni di quest'ultima, di cruciale importanza per lo sviluppo fetale.

Altri studi relativi all'apparato genitale femminile, hanno riguardato l'espressione dell'OxA e dell'OX1R nelle ghiandole vestibolari del bovino, considerate l'analogo femminile della prostata nel maschio. Le cellule immunoreattive a tali peptidi sono presenti negli adenomeri e nei dotti escretori delle suddette ghiandole (Pavone et al., 2009).

I dati presenti in letteratura sulle modalità con cui l'OxA influenza l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi sono numerosi e descrivono che l'azione ipotalamica del peptide si svolga in sinergia con il neuropeptide NPY ed il relativo recettore Y1NPY (Russell et al., 2001b). L'OxA inoltre agisce stimolando la produzione dell'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante in espianti ipotalamici di ratti maschi e femmine. D'altronde controverse sono le variazioni dei livelli plasmatici dell'ormone luteinizzante (LH) in femmine di ratto ovario-isterectomizzate in seguito al trattamento con OxA e OxB (Pu et al., 1998).

1.5. Le gonadi maschili e la spermatogenesi nei mammiferi

Le gonadi maschili, o testicoli, sono gli organi in cui risiedono e si sviluppano le cellule germinali destinate a formare i gameti maturi, gli

spermatozoi. Il processo di maturazione delle cellule germinali avviene nei tubuli seminiferi, caratterizzati da un epitelio pluristratificato e da una cavità luminale in cui sono rilasciati gli spermatozoi. L'epitelio seminifero consiste di due tipi cellulari, somatico e germinale. Le cellule germinali sono osservabili a diversi livelli dalla base del tubulo fino al lume, e sono circondate dal citoplasma delle cellule somatiche, dette cellule del Sertoli. Esternamente, i tubuli sono circondati da una lamina basale, costituita da uno o più strati di cellule mioidi che si contraggono ritmicamente, e da un tessuto fibroso ricco di collagene che le separa dall'interstizio (Davidoff et al., 1990). Il movimento della lamina genera contrazioni peristaltiche del tubulo seminifero, che determinano il passaggio degli spermatozoi dal tubulo alla rete testis, dalla quale originano i condotti efferenti che si aprono nell'epididimo (Holstein et al., 1996). Le cellule del Sertoli presentano una forma colonnare, con la base rivolta verso la lamina. Durante il periodo embrionale e fino alla pubertà le cellule del Sertoli si dividono per mitosi, che cessano nell'individuo adulto. Nella gonade matura esse presentano un citoplasma esteso per l'intera altezza dell'epitelio e sono caratterizzate da ramificazioni che circondano le cellule germinali (Russel e Griswold, 1993). Le loro funzioni principali sono di nutrimento e protezione delle cellule germinali, che durante il loro sviluppo, instaurano con esse contatti

dovuti principalmente alla presenza di N-caderine. Inoltre, le cellule del Sertoli formano tra loro giunzioni serrate o occludenti. Durante il processo di divisione e differenziamento, le cellule germinali si spostano progressivamente dalla base della membrana verso il lume slittando lungo il fianco delle Sertoli alla cui membrana, d'altronde aderiscono per mezzo dei complessi 17 di giunzione. I contatti Sertoli-Sertoli portano, inoltre, alla formazione di una barriera emato-testicolare, che divide in due comparti l'epitelio seminifero: il compartimento basale contenente cellule diploidi (spermatogoni e spermatociti I fino allo stadio di preleptotene), ed il compartimento luminale che contiene spermatociti I successivi al preleptotene, spermatociti II, spermatidi e spermatozoi. Separando la regione del tubulo dove avviene la spermiogenesi dall'interstizio del testicolo, la barriera impedisce agli antigeni di membrana delle cellule germinali non diploidi di passare nel torrente circolatorio, evitando il rischio di una reazione autoimmune. Inoltre, essa protegge la regione intratubulare da sostanze potenzialmente dannose trasportate dal sangue. Le cellule germinali si sviluppano come un sincizio, o unità clonale, dato che dopo la divisione restano connesse le une alle altre per mezzo di ponti intercellulari. Tale processo di divisione incompleta assicura lo sviluppo sincrono e consente una comunicazione rapida tra le cellule. Vaste aree dei tubuli contengono,

così, un elevato numero di cellule germinali allo stesso livello di maturazione, permettendo l'identificazione di diversi stadi nel corso del ciclo maturativo.

I tubuli seminiferi convergono verso l'ilo del testicolo, dove assumono un andamento rettilineo, per cui sono detti tubuli retti; questi continuano poi con la rete testis. Ad essa seguono i canali efferenti, l'epididimo ed il condotto deferente o dotto di Wolf, che si apre nell'uretra. Tra i tubuli seminiferi è presente del connettivo molto vascolarizzato, il tessuto interstiziale, caratterizzato da gruppi di cellule del Leydig, di forma poligonale (Davidoff et al., 1993), che secernono androgeni. Un tessuto connettivo di tipo fibroso, la tunica albuginea, forma, inoltre, una guaina di protezione disposta intorno al testicolo (Middendorff et al., 2002).

La spermatogenesi è il processo di sviluppo e differenziamento delle cellule germinali in spermatozoi, realizzato all'interno dell'epitelio seminifero. Nei mammiferi la spermatogenesi è di tipo continuo. Nello spessore dell'epitelio seminifero le cellule germinali sono distribuite secondo un gradiente che procede dalla membrana basale verso il lume del tubulo in base alla successione di divisioni mitotiche e meiotiche che avvengono a partire dagli spermatogoni proseguendo nelle cellule germinali successive. Il processo è espletato nell'adulto

in base alla seguente progressione di tipi germinali: spermatogoni, spermatociti I, spermatociti II, spermatidi, spermatozoi. La spermatogenesi inizia con le divisioni mitotiche degli spermatogoni, che si verificano per tutta la vita riproduttiva. Gli spermatogoni, alcuni, caratterizzati da una maggiore percentuale di eucromatina, contribuiscono a mantenere la riserva di cellule staminali, mentre altri, distinguibili per l'elevato contenuto eterocromatinico, iniziano la linea del differenziamento (Clermont et al., 1966). Questi ultimi vanno incontro a un limitato accrescimento, mutandosi in spermatociti I, che iniziano la profase della meiosi. A seguito della dissociazione transitoria delle giunzioni occludenti tra le cellule del Sertoli, gli spermatociti I migrano dal compartimento basale, più esterno, verso quello adluminale. Dopo la I divisione meiotica, gli spermatociti II, aploidi e di ridotte dimensioni, si dividono rapidamente, dando origine agli spermatidi rotondi. Questi affrontano le fasi del differenziamento terminale (spermiogenesi), che si realizzano in prossimità del lume dei tubuli seminiferi, dove avviene il rilascio degli spermatozoi maturi. Durante la spermiogenesi gli spermatidi vanno incontro ad alcuni notevoli cambiamenti: la cellula inizia ad allungarsi e ad acquisire una marcata polarità; dall'apparato del Golgi ha origine una formazione vescicolare di tipo lisosomiale, che gradualmente si dispone e si appiattisce sul nucleo, definita

acrosoma (Clermont e Tang, 1985; Thorne-Tjomsland et al., 1988. Durante l'allungamento degli spermatidi avvengono interazioni nucleo-acrosoma, mediate dallo strato citoscheletrico subacrosomale, che definiscono la porzione apicale del nucleo e della cellula la quale è, invece, caratterizzata, caudalmente, dalla presenza di gruppi di microtubuli. Il nucleo subisce una forte condensazione, mediata dalla sostituzione degli istoni legati alla cromatina con le protammine. La forma della testa degli spermatozoi risulta, pur con diversità dipendenti dalla specie, allungata in senso antero-posteriore (Hess, 1998; Fouquet e Kann, 1994).

Intanto, in direzione opposta rispetto a quella della vescicola acrosomiale si dispone una coppia di centrioli; da quello più distale inizia la formazione del flagello. Infine, la quasi totalità del citoplasma dello spermatidio originario è eliminata sotto forma di un corpo residuo, e gli spermatozoi così ottenuti si distaccano dalle cellule del Sertoli e sono rilasciati all'interno del lume dei tubuli seminiferi. Essi infine progrediscono verso le vie efferenti grazie alla contrazione delle cellule peritubulari mioidi. E' importante notare che nella zona del tubulo seminifero in cui si sono avuti maturazione e distacco di spermatozoi una nuova generazione di spermatogoni ha iniziato a moltiplicarsi dando origine ad una nuova ondata

spermatogenica (**Fig. 13**). Così, prima che termini il differenziamento degli spermatozoi di una zona tubulare, altri cicli sono in atto in una stessa zona dell'epitelio seminifero. Ciò spiega la sovrapposizione, in una stessa area dell'epitelio germinativo di cellule a stadi diversi di differenziamento.

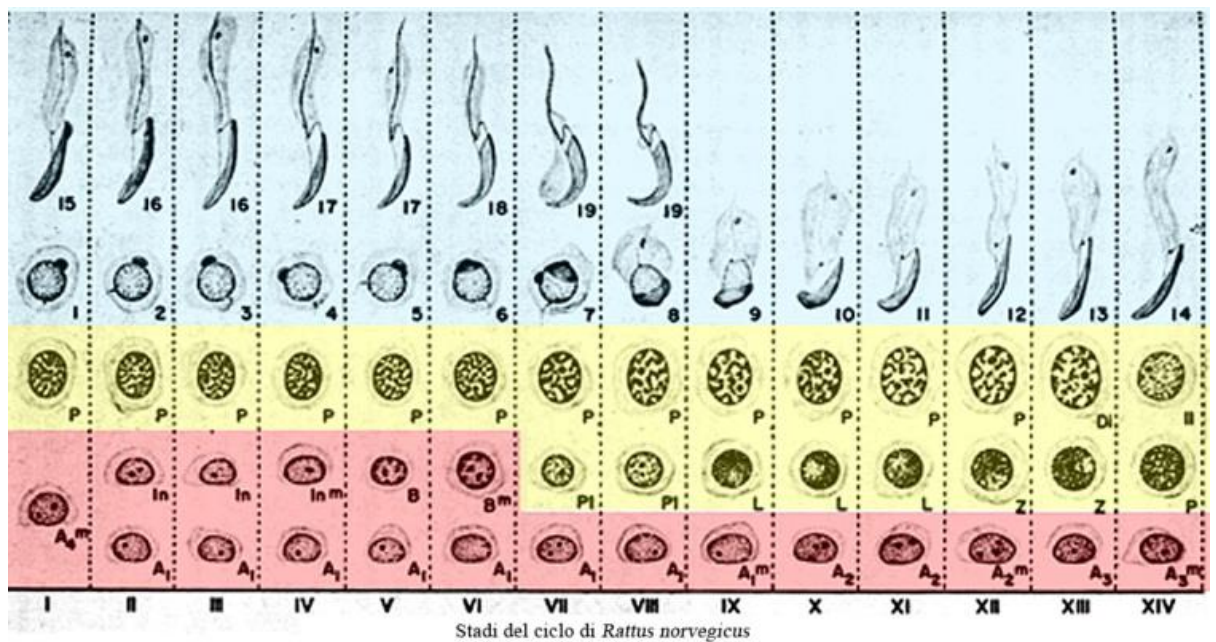


Fig. 13 La spermatogenesi nei mammiferi

1.6. Anatomia e fisiologia dell'apparato genitale maschile del ratto e dell'alpaca (*Vicugna pacos*)

L'apparato genitale maschile è composto dai testicoli o gonadi maschili, che provvedono alla spermatogenesi ed alla produzione del testosterone. L'apparato è, inoltre, formato da condotti pari (epididimo, dotti deferenti e condotti eiaculatori) ed impari (uretra pelvica e peniena) che si susseguono in senso antero-posteriore e convogliano le cellule riproduttive. Le ghiandole annesse ed il pene, organo dell'accoppiamento, completano i genitali. I testicoli sono contenuti nello scroto e da ciascuno di essi si origina un dotto deferente che sbocca nell'uretra poco oltre il collo vescicale. Applicato al margine dorsale del testicolo si trova il condotto epididimale che svolge la funzione di trasporto e capacitazione degli spermatozoi.

Il testicolo è avvolto da una tunica fibrosa esterna, l'albuginea, che invia all'interno del parenchima setti connettivali che formano le logge testicolari. I setti si riuniscono dorsalmente a formare il mediastino. Le logge contengono, come descritto più in dettaglio in precedenza, i tubuli seminiferi contorti e negli spazi interstiziali le cellule interstiziali o del Leydig. I testicoli nel ratto, a differenza delle altre specie presentano localizzazione intra-addominale.

L'epididimo è un unico, lungo condotto interposto tra la rete testis ed il dotto deferente. È costituito dalla porzione della testa, del corpo e della coda. La testa è anatomicamente connessa alla porzione anteriore del testicolo mediante i canalicoli o duttuli efferenti ed è solidamente collegata ad esso mediante il legamento della testa dell'epididimo. Il corpo è ben sviluppato e costeggia il margine superiore del testicolo. La coda non è in continuità anatomica con l'estremità caudale del testicolo alla quale tuttavia è unita dal legamento proprio del testicolo. L'epididimo si origina dalla confluenza dei duttuli efferenti e presenta un decorso assai contorto. La parete del canale epididimale consta di tre tuniche: mucosa, muscolare ed avventizia. La tunica mucosa è costituita da un epitelio di rivestimento caratterizzato da 5 o 6 tipi cellulari differenti che poggiano su una lamina propria. Le cellule epiteliali più caratteristiche e diffuse sono definite "principali" ed hanno forma cilindrica. L'apice di tali elementi cellulari è costituito da una propaggine conica formata da strutture microvillari che risultano prive di motilità. L'altezza di tali microvilli si riduce procedendo dalla testa alla coda dell'organo. Sovente il citoplasma apicale delle cellule cilindriche presenta un gran numero di microvescicole che documentano l'esistenza di un'attività secretoria assai intensa. La tunica muscolare è costituita da fascetti di fibrocellule disposti

circolarmente ed aumenta di spessore verso la coda, in cui compaiono alcuni fascetti muscolari a disposizione longitudinale. La tunica muscolare è responsabile dell'attività motoria dell'epididimo. Nelle fasi immediatamente precedenti l'eiaculazione insorgono, per stimoli trasportati da fibre vegetative adrenergiche, contrazioni coordinate ed intense dell'organo che permettono il rapido trasporto degli spermatozoi verso il canale deferente e quindi verso l'uretra. La tunica avventizia è sottile, fibrosa e si confonde con il connettivo intertubulare derivante dalla tunica albuginea.

L'alpaca (*Vicugna pacos*) rappresenta una delle specie domestiche di camelidi diffusi in Sud America. All'aspetto ricorda molto una pecora, anche se rispetto ad essa ha dimensioni maggiori e un collo molto lungo. L'alpaca è un ruminante che possiede, come noto, tre stomaci per la digestione della fibra. In media ogni animale mangia circa un chilogrammo di vegetali al giorno e come tutti i camelidi non ha bisogno di grandi quantità di acqua. Esistono due razze di alpaca: la razza Huacaya e la razza Suri. La popolazione mondiale stimata di alpaca è di 3,5 milioni. L'87% di questi è allevato in Perù, fonte dell'80% dell'offerta mondiale di fibra tessile prodotta dal vello dell'alpaca, che è considerata fibra animale pregiata (Ruiz-Bejar, 2011). Negli anni '90 circa 5000 famiglie peruviane

dipendevano direttamente dall'allevamento di alpaca e lama, oltre alla restante parte di esse che beneficiava dei loro prodotti (fibra e carne) e sottoprodotti (sterco e pelle), (Ruiz-Bejar, 2011).

La carne di alpaca è consumata nelle zone altoandine di Perù, Bolivia, Cile e Argentina, in forma di carne fresca o essicata. Attualmente è stato riscontrato anche in Italia un grande interesse per l'allevamento di tale specie. I maschi entrano in riproduzione a tre anni di età, le femmine a due. Il raggiungimento della pubertà dipende dal peso corporeo. Con alimentazione basata solo sul pascolo naturale, ad 1 anno le femmine raggiungono il 60% del peso definitivo, a cui corrisponde un tasso di concepimento del 70% (Fowler, 2010). E' comunque pratica usuale attendere i due anni di età per la loro riproduzione. I maschi presentano interesse sessuale a partire da un anno, ma la presenza di un'aderenza prepuziale, ed il peso corporeo insufficiente per la monta, fanno sì che vengano messi in riproduzione dai tre anni in poi.

Nonostante i camelidi non siano considerati specie a ciclo riproduttivo stagionale (Vaughan e Tibary, 2006), le pratiche di allevamento adottate in Sud America concentrano il periodo degli accoppiamenti nella stagione delle piogge, per sfruttare il periodo di massima disponibilità di cibo. L'effetto dell'alimentazione si

manifesta beneficamente non solo sulle femmine ma anche sui maschi. La produzione di testosterone negli alpaca infatti è correlata con le buone condizioni corporali (Stelletta, 2009).

Per quanto riguarda l'apparato genitale maschile, nei camelidi in generale, le gonadi hanno aspetto ovoide e sono collocate nello scroto in posizione perineale come nel cane e nel suino (Bravo et al., 2000). Nell'alpaca i testicoli non sono collocati nella borsa scrotale alla nascita e la discesa di tali organi avviene intorno ai 6 mesi di età. Le gonadi presentano un peso di circo 18 g, che rappresenta approssimativamente lo 0.02-0.03% del peso corporeo totale. Il diametro dei tubuli seminiferi in tale specie, oscilla tra i 174 ed i 237 μm (Casas et al., 1993-1996). L'epididimo è localizzato lungo il margine anteriore del testicolo e si estende dall'estremità inferiore a quella superiore. Macroscopicamente, è suddiviso nelle regioni della testa, corpo e coda. Istologicamente, l'epididimo presenta 6 segmenti differenziati. Il primo segmento è breve ed è il punto in cui i duttuli efferenti si congiungono all'epididimo; il secondo ed il terzo presentano una maggiore altezza dell'epitelio ed un'intensa attività mitotica nonché una lieve attività della lattato deidrogenasi (LDH). Le cellule epiteliali del quarto segmento presentano positività alla reazione dell'acido periodico di Schiff e contengono granuli di

secrezione amilasi e neuroamidasi resistenti. Il quinto segmento presenta un'intensa attività della fosfatasi acida e dell'LDH. Il sesto segmento presenta un attività della fosfatasi acida ed alta dell'LDH (Dehlon e von Lawzewitsch, 1994).

I condotti deferenti, avvolti nel funicolo spermatico, misurano circa 35-40 cm in tutti i lamoidi. Presentano, inoltre, una dilatazione fusiforme, terminale, nota come ampulla. Quest'ultima non è identificabile nei cammelli (Zhao, 1995). Nei lamoidi l'ampulla è localizzata dorsalmente alla vescica (Osorio e San Martin, 1966). Studi istologici condotti sul di essa rivelano un ispessimento della sottomucosa contenenti adenomeri ghiandolari. Nel maschio sessualmente maturo dell'alpaca, non è stato riscontrato un numero elevato di spermatozoi in questo tratto.

Il pene, nei lamoidi, è di natura fibroelastica con una porzione sigmoide collocata anteriormente allo scroto, non posteriormente come accade nel toro. La sua lunghezza è di circa 35-40 cm. Il distacco del glande dal prepuzio sembra essere associato alla sintesi di testosterone. Nell'alpaca, il 12.2% di maschi mostra tale fenomeno intorno ai 12 mesi di età, ed ai 24-34 mesi, il pene appare completamente distaccato dal prepuzio nel 59.5% e 94.4% dei maschi, rispettivamente. Il prepuzio, in tutti i camelidi, è diretto

caudalmente ma durante l'erezione i muscoli prepuziali craniali, piegano in avanti prepuzio e pene dalla loro posizione arretrata di riposo. Le ghiandole sessuali accessorie sono la prostata e le bulbouretrali. La prima consta di due porzioni, una porzione diffusa ed una compatta, che formano una sorta di H collocata dorsalmente all'uretra pelvica. La capsula che riveste la prostata appare sottile ed è fornita di fibre muscolari lisce. Le ghiandole bulbouretrali presentano forma di una mandorla e sono collocate ad entrambi i lati dell'uretra pelvica. Tali ghiandole sono fornite di una capsula contenente muscolatura striata.

1.7. Anatomia della prostata umana

La prostata è una ghiandola impari e mediana situata fra la base della vescica e il diaframma urogenitale, dietro la sinfisi pubica e dinnanzi all'ampolla rettale. E' in stretta connessione con la prima porzione dell'uretra (uretra prostatica) nella quale essa riversa, durante l'eiaculazione, il proprio secreto tramite i dotti escretori. Nella parte postero-superiore è in contatto con i condotti eiaculatori. La prostata ha la forma di una castagna con la base superiore e l'apice inferiore; il

suo asse non è esattamente verticale ma diretto obliquamente in basso ed in avanti ed incrocia l'asse dell'uretra, formando un angolo di circa 20°. La prostata è contenuta in un involucro fibroso (loggia prostatica) attraverso il quale contrae rapporti con gli organi vicini. Superiormente la base della prostata aderisce alla vescica nella zona del meato uretrale interno e del trigono, mentre posteriormente è in rapporto con le ampolle deferenziali, con l'apice delle vesciche seminali e con i condotti eiaculatori.

La prostata è formata da un complesso di circa 30-50 subunità ghiandolari ramificate con adenomeri tubuloalveolari (otricolari), che si aprono mediante 15-30 dotti escretori nell'uretra prostatica, prevalentemente in corrispondenza della parete posteriore, ai lati del collicolo seminale (seno prostatico). Le subunità ghiandolari possono essere schematicamente raggruppate in un lobo anteriore, un lobo medio e due lobi laterali. Il lobo anteriore è posto superiormente all'uretra ed è formato da poche ghiandole di piccolo volume; il lobo medio, situato fra l'uretra e i dotti eiaculatori, è di dimensioni variabili e in qualche caso è privo di strutture ghiandolari, i lobi laterali, destro e sinistro, sono i più voluminosi e sono collocati posteriormente ad un piano frontale passante per i condotti eiaculatori. La porzione di parenchima ghiandolare situata dietro ai

condotti eiaculatori viene anche considerata da alcuni come lobo posteriore. Ulteriormente, la prostata viene divisa, in quattro zone anatomiche: una zona periferica (70% del tessuto ghiandolare), una zona centrale (20%), una zona di transizione (5%) e lo stroma fibromuscolare. La zona periferica forma la porzione postero-laterale della ghiandola e rappresenta la zona dove più frequentemente insorge il carcinoma prostatico. La zona centrale è in contatto con i dotti eiaculatori e forma la base della ghiandola. La zona di transizione è costituita da due piccoli lobi che sono in stretto contatto con l'uretra prostatica, ed è la zona dove più frequentemente si evidenzia l'iperplasia prostatica benigna. Non è presente una vera e propria capsula anatomica: lo stroma fibromuscolare gradualmente si estende nel connettivo lasso che circonda l'organo, senza un vero e proprio confine netto. Nel connettivo lasso perighiandolare, postero-lateralmente alla ghiandola decorrono i fasci neurovascolari, deputati all'erezione.

1.8. Ruolo delle orexine nei fenomeni neoplastici

L'incremento dell'incidenza di patologie a carattere neoplastico ha posto le basi per una possibile correlazione delle orexine con i meccanismi patogenetici della carcinogenesi. Le orexine in seguito al

legame con i relativi recettori OX1R ed OX2R, sono coinvolte nell'apoptosi ed in una drastica riduzione della proliferazione cellulare in numerose linee cellulari cancerose. Entrambe le orexine, infatti, agiscono come agenti pro-apoptotici sulle linee cellulari cancerose HT29-D4 di colon umano causando alterazioni della morfologia cellulare, frammentazione del DNA, condensazione della cromatina, rilascio citosolico del citocromo ed attivazione delle caspasi 3 e 7 (Rouet-Benzineb et al., 2004). Analoghi risultati sono stati riscontrati sulla linea cellulare CHO trasfettata con OX2R e sulla linea cellulare pancreatica di ratto AR42J esprimente OX2R e non OX1R, successivamente al trattamento con le orexine (Voisin et al., 2006). Il trattamento con OxA determina inibizione della proliferazione cellulare mediante l'attivazione delle caspasi in cellule C6 di glioma di ratto, esprimenti entrambi i recettori per le orexine (Voisin et al., 2008). L'OxA causa spiccato effetto apoptotico in cellule umane di cancro del colon resistenti all'esposizione al 5-fluoracile. Se tali linee cellulari vengono xenotrapiantate in topi, l'OxA determina forte inibizione dello sviluppo neoplastico (Biegańska et al., 2011).

Nell'ambito clinico è stato riscontrato che un ridotto livello di OxA nel liquido cerebrospinale è associato ad una elevata incidenza di

tumori ipotalamici (Nokura et al., 2004) ed un ridotto livello sierico di OxA, in concomitanza al silenziamento epigenetico dell'OX2R, è stato correlato al cancro endometriale (Dehan et al., 2013). Tali evidenze hanno consentito di considerare i recettori per le orexine quali “targets” terapeutici, soprattutto per il trattamento del cancro del colon umano.

Dall'altra parte, dalla letteratura risulta che l'OxA stimola la proliferazione dei pre-adipociti 3T3-L1 e decrementa l'effetto pro-apoptotico da parte della caspasi 3, attraverso la via dell'ERK 1/2 (Skrzypski et al., 2012).

Kishida e collaboratori (2012) hanno evidenziato che l'OX2R è espresso in alcune tipologie di cancro, ma non nelle cellule dei relativi tessuti normali, per cui, in tali casi, l'OX2R potrebbe essere considerato marker di neoplasia.

Il cancro prostatico è la terza più comune causa di morte tra gli uomini negli ultimi decenni (De Santis et al., 2014). La prostata è un organo androgeno-dipendente capace di sintetizzare recettori per gli androgeni (AR). E' ormai noto che tali ormoni, in caso di neoplasia prostatica sono in grado di attivare fattori di trascrizione che aggravano fortemente l'andamento della malattia (Shafi et al., 2013). Per tale motivo, il trattamento del cancro prostatico consiste nella

privazione del testosterone circolante. Nonostante ciò in alcuni casi l'andamento della malattia risulta resistente a tale terapia (Grossman et al., 2013). In letteratura è stato rinvenuto un unico studio inerente il ruolo delle orexine e del recettore OX1R nel cancro prostatico umano (Alexandre et al., 2014). Secondo tale studio, l'OX1R è espresso nei foci carcinomatosi con differenziazione in senso neuroendocrino che individuano un alto grado di cancro prostatico. Inoltre l'OX1R risulta essere espresso nella linea cellulare carcinomatosa DU145 caratterizzata dall'acquisizione del fenotipo neuroendocrino nelle quali il trattamento con OxA induce effetto pro-apoptotico. Tale risultato autorizza ulteriormente l'ipotesi che le orexine possano essere utilizzate nella terapia antineoplastica.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Reagenti chimici ed anticorpi

Per lo svolgimento della sperimentazione sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti-OxA (MAB763) ed anti-OxB (MAB734) forniti dalla R&D System (Abingdon, UK) e gli anticorpi policlonali anti-OX1R (sc-8072) ed anti-OX2R (sc-8074) e monoclonale anti-pospho-ERK1/2 (sc-7383) forniti dalla Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). I relativi peptidi di controllo sono stati forniti per l'OxA e l'OxB dalla Tocris Bioscience (Bristol, UK) e quelli relativi all'OX1R ed all'OX2R dalla Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorpo anti-prepro-orexina (AB3096), il suo peptide di controllo (AG774) e l'anticorpo monoclonale anti-tubulina (MAB1637) è stato fornito dalla Chemicon International Inc. (Temecula, CA, USA), mentre gli anticorpi secondari coniugati con la perossidasi sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, U.S.A.). Gli anticorpi secondari biotinilati e il complesso avidina-biotina sono stati acquisiti dalla Vector Laboratories (Burlingame, U.S.A.).

La leupeptina, l'aprotinina, la pepstatina, la glicina, il rosso ponceau, l'albumina serica bovina (BSA) provengono dalla Sigma-Aldrich. Il latte disidratato in polvere è stato fornito dalla Biorad (Milano, Italia),

l'acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA) dalla Applichem (Napoli, Italia). Il glicerolo, l'ammonio persolfato (APS), la tetra-metil-etilen-diammina (Temed) ed il Tween-20 sono stati forniti dalla Pharmacia Biotech (Uppsala, Svezia). Il Tris-(idrossimetil)-amminometano, il β -mercaptoetanololo, il blu di bromofenolo ed il metanolo sono stati acquisiti dalla Carlo Erba (Milano, Italia). La membrana di nitrocellulosa Protran della Schlecker & Schnell (Keen, NH, U.S.A), le lastre di sviluppo ed i reagenti ECL della Amersham Corp. (Little Chalfont, UK) ed il Triazol dalla Invitrogen (Milano, Italia). I primers sono stati acquisiti dalla Primm (Milano, Italia) ed i kit per la PCR e l'RT-PCR dalla Promega (Milano, Italia). I peptidi OxA (003-30) ed OxB (003-32) sono stati acquistati dalla Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Karlsruhe, Germany), l'antagonista dell'OX1R SB-408124 (Sr694) (Maleherbe et al., 2009) e del recettore 2 (TCS OX2 29) dalla Tocris Bioscience (Bristol, UK) e l'LH (L5269) dalla Sigma Chemical Co. Il MIS (sc-111265) è stato acquistato dalla Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). L'EIA kit per la determinazione del testosterone è stato fornito dall'Adaltis ed il kit ELISA per la valutazione della traslocazione degli AR è stato fornito dall'Abcam (Cambridge, UK). La sonda fluorescente QF8 (21095) proviene dall'ABD Bioquest (Sunnyvale, CA, USA), il kit ELISA per la valutazione del cAMP (900-066) da Enzo Life Sciences (Lausen,

Switzerland) ed il kit di analisi del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) (10009365) da Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA).

2.2. Prelievo dei campioni

Le specie animali utilizzate in questo lavoro di tesi sono il ratto, l'alpaca e l'uomo. I ratti maschi sessualmente maturi sono stati mantenuti in ottime condizioni di salute in appositi stabulari. Le procedure sperimentali sono state effettuate secondo le normative vigenti che tutelano il benessere degli animali da laboratorio. Gli animali sono stati anestetizzati prima dei prelievi e successivamente sacrificati. Gli alpaca utilizzati per la nostra ricerca sono stati allevati in ottime condizioni sanitarie e nutrizionali in allevamenti del centro Italia. I soggetti avevano all'incirca 6 anni ed erano da considerarsi sessualmente maturi. Essi sono stati sottoposti ad orchietomia secondo le procedure descritte da Fowler (1998). Ciascun testicolo prelevato è stato separato dal relativo epididimo, il quale è stato suddiviso nei 3 segmenti testa, corpo e coda. I campioni di prostata umana normale, iperplastica e neoplastica sono stati ottenuti da pazienti ospedalizzati presso il Reparto di Urologia dell'Ospedale A. Cardarelli di Napoli e sottoposti a cistectomia a causa di cancro vescicale o prostatectomia per fenomeni iperplastici e/o neoplastici.

Le procedure sperimentali sono state approvate secondo le normative descritte nella Dichiarazione di Helsinki ed i pazienti sono stati informati del loro contributo alla ricerca.

I campioni prelevati sono stati in parte immersi in liquido fissativo (Bouin o formaldeide al 10%) e inclusi in Paraplast, in parte processati per le prove in vitro ed in parte conservati a -80°C per le tecniche del western blotting e dell'RT-PCR.

2.3. Immunoistochimica

I campioni immersi in liquido di Bouin o formaldeide al 10% per 24 ore, sono stati sottoposti a disidratazione alcolica e, quindi, immersi in metilbenzoato per 48 ore. Trascorso questo periodo di tempo, essi sono stati inclusi in Paraplast e tagliati al microtomo in sezioni di 5-6 µm che sono state montate su vetrini porta-oggetto. Sezioni seriate di 3 µm di spessore sono state singolarmente montate su vetrini numerati allo scopo di osservare campi microscopici strettamente consecutivi. Le sezioni sono state colorate con la metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. La prima fase prevede la sparaffinatura delle sezioni in xilolo e la loro idratazione mediante una serie discendente di alcoli ed acqua distillata. Alcune sezioni sono state sottoposte alla tecnica di smascheramento antigenico per la riesposizione di antigeni mascherati durante la fissazione. A tale scopo esse sono state immerse

in tampone citrato (pH 6) e riscaldate al massimo della temperatura (700/750 W) in forno a microonde. Dopo tale fase, le sezioni sono state incubate in acqua ossigenata al 3% per 30 minuti a temperatura ambiente, sottoposte a 3 lavaggi con PBS per 4 minuti ciascuno e coperte con siero normale di capra e/o coniglio per 30 minuti. Questa fase si conclude con l'incubazione degli anticorpi primari OxA, OxB, OX1R e OX2R, diluiti 1:200, sulle sezioni in camera umida a 4°C per una notte. Il giorno seguente, le sezioni sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS di 4 minuti ciascuno ed incubate con gli anticorpi secondari biotinilati, diluiti 1:200, per 30 minuti a temperatura ambiente. Il passaggio successivo ha previsto 3 lavaggi in PBS e l'adsorbimento con il complesso avidina-biotina per 30 minuti. La colorazione finale è stata effettuata mediante la 3-3' diaminobenzidina (DAB) applicata alle sezioni per un tempo variabile da 2 a 10 minuti. Dopo un lavaggio finale in acqua distillata, le sezioni sono state disidratate attraverso una serie ascendente di alcoli, chirificate in xilolo e montate con Eukitt.

2.4. Preparazione di omogenati di tessuto

Ai tessuti prelevati, pesati e sminuzzati in piccoli pezzi, è stato aggiunto un tampone di lisi (5 ml/1,5 g di tessuto) composto da: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF,

0,5% acido deossicolico, 0,1% sodio dodecilsolfato (SDS), 1% Nonidet P-40, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro, 0,1 U/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina e 1 mM Na₃VO₄. I campioni, mantenuti a 4°C, sono stati omogenati con apparecchio Ultraturrax L-407, centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C e conservati a -80°C fino al momento dell'uso. La quantità di proteine contenute nei campioni omogenati è stata determinata utilizzando il reattivo "Bio-Rad protein assay". L'assorbanza è stata misurata mediante uno spettrofotometro Varian Cary 1 (Varian, Inc., CA, USA) ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione proteica del campione si ottiene estrapolando il valore di assorbanza del campione in esame da una curva standard ottenuta misurando l'assorbanza di soluzioni di BSA a concentrazione nota.

2.5. Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting

I campioni contenenti uguali quantità di proteine totali sono stati dapprima riscaldati per 5 minuti in un tampone contenente 50 mmol Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5% β-mercaptoetanololo. E' stato, quindi, effettuato il passaggio dei campioni su gel di poliacrilammide per elettroforesi della Bio-Rad ed immerso nel tampone di corsa costituito da 25 mM Tris, 250 mM

glicina, 0,1% SDS (pH 8,3). I campioni da separare sono stati trasferiti su un gel al 4% di poliacrilammide che ha la funzione di condensare le proteine contenute in ciascun campione in una sottile banda ed infine, per la rilevazione della prepro-orexina, dell'OX1R e dell'OX2R è stato utilizzato un gel di separazione al 12,5% di poliacrilammide.

Dopo l'elettroforesi SDS-PAGE, le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando un apposito apparecchio di trasferimento della Bio-Rad. L'avvenuto trasferimento delle bande proteiche è stato visualizzato mediante colorazione per 10 minuti del filtro di nitrocellulosa con il colorante rosso ponceau. I filtri sono stati saturati mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 5% di latte disidratato in TBS-T 0,1% (150 mmol NaCl, 20 mmol Tris-HCl, pH 7,4, Tween-20 0,1%). Dopo il periodo di incubazione, i filtri sono stati lavati in TBS-T ed incubati per 2 ore a temperatura ambiente a 4°C con l'anticorpo specifico diluito 1:1000 in TBS-T, contenente il 2,5 %di latte disidratato. Successivamente sono stati effettuati lavaggi in TBS-T ed un'incubazione per 1 ora con un anticorpo secondario anti-IgG coniugato con perossidasi, diluito 1:3000 in TBS-T, contenente il 2,5 %di latte disidratato. Le proteine oggetto di studio sono state visualizzate mediante un metodo di chemiluminescenza (ECL).

Quindi i filtri sono stati sottoposti a procedura di “stripping” immergendoli in una soluzione costituita da 100 mM β -mercaptoetanololo, 2 % SDS, 62 mM Tris-HCl, pH 6,8, per 20 minuti a 50-60°C. Il filtro viene lavato con una soluzione tampone e sullo stesso viene effettuato un nuovo Western blotting per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è costante.

2.6. Estrazione di RNA da tessuti

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti, precedentemente congelati a -80°C, utilizzando come reagente il Trizol contenente fenolo e guanidina isotiocianato.

I tessuti sono stati incubati con Trizol (1 ml/100 mg o 1 ml/piastra) per 5 minuti a 30°C e con cloroformio per 3 minuti alla stessa temperatura. Sono state ottenute, in seguito a centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C, una fase acquosa e una fase fenolica. La fase acquosa è stata incubata con isopropanolo per 10 minuti a 30°C e successivamente centrifugata a 14.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet di RNA ottenuto è stato lavato con etanolo al 75 %, centrifugato a 8.500 rpm per 5 minuti a 4°C ed incubato con acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) per 10 minuti a 55-60°C.

La quantità di RNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro utilizzando i valori di assorbanza a 260 e 280 nm.

Per valutare il grado di purezza dell'RNA estratto il campione ottenuto è stato caricato su un gel di agarosio (1%) - formaldeide in condizioni denaturanti. Gli RNA ribosomiali (18 S e 28 S) apparivano chiaramente risolti.

2.7. RT-PCR

La reazione a catena della polimerasi con trascrittasi inversa (RT-PCR) viene utilizzata per amplificare DNA a partire da un pool di RNA di un tipo cellulare. La trascrizione inversa genera una copia del filamento di RNA sotto forma di filamento di DNA complementare (cDNA). Tale filamento costituisce il substrato per l'amplificazione nella PCR. La RT-PCR comprende due tappe fondamentali: la retrotrascrizione dell'RNA e l'amplificazione del cDNA ottenuto con la retrotrascrizione. Nella prima fase della trascrizione inversa, primers non specifici o "random examers", che consistono in piccoli oligonucleotidi, ibridizzano con l'RNA bersaglio e vengono estesi dall'enzima trascrittasi inversa dando origine a numerosi filamenti di cDNA.

Per la nostra sperimentazione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 5 µg di RNA in un volume di 5 µl di acqua sterile e "random examer". Questa miscela è stata incubata a 70°C per 5 minuti e a 4°C per 5 minuti. Nel frattempo, è stata preparata una miscela di reazione

contenente: un tampone di reazione 5x, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, inibitore di RNasi e enzima ImProm II Reverse Transcriptase, in un volume finale di 15 µl di H₂O-DEPC. La miscela contenente l'RNA e la miscela di reazione sono state unite e incubate per 5 minuti a -20°C, per 1 ora a 42°C e per 15 minuti a 70°C. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

Per il ratto è stata utilizzata una serie di primers specifici:

- recettore OX1R:

5'-AGGCTGCGGTCATGGAAT-3' (senso),

5'-TTCCTGACCAGGGCTGAC-3' (antisenso);

-recettore OX2R:

5'-TGTCCAGCACCAAATTGGAG-3' (senso),

5'-ACCATCGGTCCAAGGCAATG-3' (antisenso);

- β-actina:

5'-GAGGCTCAGAGCAAGAGAGG (senso),

5'-TGACATCTCGCACAATCTCC-3' (antisenso).

Per l'uomo sono stati utilizzati i seguenti primers specifici:

-prepro-orexina:

5'-CGTCTTGCTCGAGATGTGATG-3' (senso),

5'-GCACACAGAGGGCTACAATGTG-3' (antisenso);

-recettore OX1R:

5'-CCCCACTGGGCCTCATG-3' (senso),

5'-CCCCAGAGCTTGCGGAATA-3' (antisenso);

- β -actina:

5'-TCAAAATGAAGTACCCCATC-3' (senso),

5'-GGCTGGAAGAGTGCCTCA-3' (antisenso).

Per l'amplificazione della prepro-orexina, dell'OX1R E dell'OX2R, la PCR è stata effettuata usando 10 μ l di cDNA a cui è stato aggiunto 1 μ l di tampone 10x privo di Mg, dNTP 10 mM, MgCl₂ 50 mM, la miscela dei primers (10 μ M) e la DNA polimerasi Platinum Taq, in un volume finale di 50 μ l. Il programma di amplificazione utilizzato ha previsto un'iniziale denaturazione per 2 minuti a 94°C, seguita da 35 cicli di denaturazione per 1 minuto a 94°C, "annealing" per 1 minuto a 56°C e un'estensione per 1 minuto a 72°C. Quale controllo interno per l'RT-PCR e l'efficienza di reazione della PCR è stata condotta in parallelo l'amplificazione della β -actina. Il prodotto di PCR è stato visualizzato elettroforeticamente su un gel di agarosio al 2% in presenza di bromuro di etidio. I prodotti di PCR sono stati estratti dal gel, purificati e sequenziati.

2.8. Test eseguiti in vitro su sezioni di testicolo di ratto e di alpaca per la determinazione del testosterone

I testicoli di ratto ed alpaca sono stati dapprima decapsulati e successivamente tagliati in piccoli sezioni di circa 250 ± 7 mg ciascuna. Le sezioni sono state distribuite in una piastra munita di pozzetti (250 mg/pozzetto) ed incubate in 1 ml di buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) [10 mM di glucosio, 100 μ M di bacitracina, 0.1 % di acido ascorbico, 0.1 % di albumina sierica bovina (BSA)], pH 7,4, per 60 minuti a 37°C in un'atmosfera costituita da 95 % di O₂/ 5% di CO₂, su piastra agitante (60 cicli/minuto). Per quanto concerne le valutazioni dei livelli di T nel testicolo di ratto, in una prima serie di esperimenti, il medium è stato sostituito con 1 ml di KRB buffer contenente 1 nM di OxA e le sezioni sono state incubate per 6 ore. Una serie parallela di incubazioni è stata effettuata in presenza ed assenza di 1 nM di MIS per 6 ore. Queste condizioni sono state scelte sulla base di test preliminari eseguiti utilizzando concentrazioni crescenti di OxA (0-2 nM) o MIS (0-2 nM) a differenti intervalli di tempo (0-6 ore). In una seconda serie di esperimenti, le sezioni sono state incubate con 1 nM di OxA o MIS a 37°C per 12 ore. Alcune sezioni, dopo 6 ore di incubazione con OxA o con MIS sono state trattate con 1 nM di MIS od OxA, rispettivamente, per altre 6 ore. Le

sezioni di controllo sono state incubate esclusivamente con il medium privo delle suddette sostanze. Alcune sezioni tissutali, inoltre, sono state trattate con l'inibitore dell'OX1R SB408124 ($1.7 \mu\text{mol/g}$ di tessuto), sia in presenza che in assenza di OxA, per 12 ore. È stato inoltre utilizzato come controllo positivo della vitalità del tessuto la sua incubazione con l'ormone LH ad una concentrazione di 500 ng/g di tessuto per 12 ore.

Un ulteriore esperimento è stato eseguito sostituendo il medium con 2 ml di buffer KRB contenente concentrazioni crescenti di OxB (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) sia in presenza che in assenza dell'antagonista di OX2R TCS OX2 29 (100 nM) ed incubando le sezioni per 12 ore.

Per quanto concerne la valutazione dei livelli di T nel testicolo dell'alpaca, nel corso di una prima serie di esperimenti il medium è stato sostituito con 1 ml di KRB contenente 1 nM di OxA o $1.7 \mu\text{mol}$ dell'antagonista specifico per il recettore 1, SB-408124. Le sezioni sono state trattate con il medium sopra descritto per 90 minuti e per alcune di esse i tempi di incubazione sono stati protratti fino a 180 minuti in presenza od assenza di 1 nM di OxA. Le sezioni di controllo sono state incubate esclusivamente con il medium, così come eseguito per il testicolo di ratto. Nel secondo esperimento, una serie parallela di incubazioni è stata effettuata in presenza di 1 nM di OxA o 1 nM di MIS per 6 ore. Alcune sezioni, previamente trattate con OxA, sono

state poi incubate con 1 nM di MIS ed altre, invece, precedentemente trattate con il MIS, sono state poi incubate con 1 nM di OxA. Le sezioni sono state incubate con le suddette sostanze per 6 ore, fino a raggiungere un tempo finale di 12 ore. Tali condizioni sono state scelte sulla base di prove preliminari eseguite utilizzando concentrazioni crescenti di OxA (0-2 nM) o MIS (0.5-2.0 nM) a differenti intervalli di tempo (0-24 ore). Allo scopo di verificare la vitalità del tessuto, alcune sezioni di testicolo di alpaca sono state trattate, così come per il testicolo del ratto, con l'ormone LH e la produzione di T è stata registrata in un intervallo di tempo compreso tra 90 e 720 minuti.

Al termine di ciascun esperimento, i livelli di T sono stati misurati utilizzando un kit immunoenzimatico come descritto in bibliografia (La Manna et al., 2007; Di Fiore et al., 1998). Nel corso della valutazione del T sono stati individuati i seguenti limiti: sensibilità 6 pg, variabilità intra-saggio del 5.3 %, variabilità inter-saggio del 7.5 %. In breve, il medium è stato mescolato con etil-etere (1:10, v/v) e la fase eterea è stata allontanata dopo una centrifugazione di 3,000 giri per 10 minuti. Sono state effettuate tre estrazioni. Gli estratti eterei sono stati sottoposti ad essiccamento mediante evaporazione ed il residuo ottenuto è stato disciolto in 0.5 ml di buffer sodio fosfato (0.05 M), pH 7,5, contenente 10 mg/ml di BSA.

Il tasso di recupero di T dal testicolo di ratto è stato di circa l'80 %. I risultati sono stati espressi in ng di T per ml di medium di incubazione. I dati ottenuti sono stati confrontati con l'analisi della varianza seguita dal test di Duncan e dallo Student t-test. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e tutti i dati sono stati espressi come media \pm SD (deviazione standard). Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0.01$ e $P < 0.05$ per gli esperimenti eseguiti su testicolo di ratto e $p < 0.01$ e $p < 0.05$ per quelli eseguiti sull'alpaca.

2.9. Colture cellulari

Nel presente lavoro sono state utilizzate due linee cellulari derivate dalla prostata umana di cui la prima ottenuta da cellule normali (PNT1A) e la seconda da cellule carcinomatose (LNCaP). Le PNT1A sono state coltivate in vitro in un Eagle Dulbecco medium modificato (DMEM) contenente il 10 % di siero fetale bovino inattivato tramite calore (FBS), 1 % di L-glutamina, 100 U ml⁻¹ di penicillina e 100 µg ml⁻¹ di streptomicina. La seconda linea cellulare è stata coltivata in vitro nel medium RPMI 1640 contenente 10 % di FBS, 2 mM di glutamina, 2 mM di piruvato di sodio, 1 X di aminoacidi non essenziali, 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml streptomicina e 10 µg/ml di gentamicina. Le cellule sono state incubate a 37°C in un

ambiente umidificato contenente 5 % di CO₂. Le cellule sono state distaccate dai supporti mediante trattamento con tripsina-EDTA.

2.10. Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata investigata mediante il metodo di esclusione al Trypan Blue effettuando un conteggio diretto delle cellule vitali in una camera emocitometrica ed il saggio di vitalità cellulare al 3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide (MTT). Quest'ultimo è un saggio di laboratorio colorimetrico standard per misurare l'attività di enzimi mitocondriali che riducono il 3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide a formazano, facendo virare il composto da un colore giallo ad un colore blu-violetto intenso. Il formazano rimane localizzato all'interno dei mitocondri, quindi deve essere solubilizzato ed estratto dalle cellule. A tale scopo, scaduto il tempo di incubazione, la piastra viene sciacquata dalla soluzione di MTT ed incubata per un minimo di 2 ore con isopropanolo (solvente di estrazione) a temperatura ambiente ed al buio perché è un composto fotosensibile. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare. La densità ottica (OD) è misurata spettrofotometricamente

ad una lunghezza d'onda pari a 570 nm. Le due linee cellulari sono state incubate in piastre da 96 pozzetti contenenti 200 µl di un medium di crescita per 24 ore. Appropriate concentrazioni di OxA sono state aggiunte alle piastre per un'ulteriore incubazione di 24 ore, mentre cellule di controllo sono state trattate con il solo medium. Successivamente, ad ogni piastra sono stati aggiunti 10 µl di soluzione di MTT per 4 ore a 37°C e in atmosfera contenente il 5 % di CO₂. Alla fine, il mezzo di coltura è stato aspirato e sostituito con 100 µl di soluzione di estrazione per dissolvere i cristalli di formazano. L'assorbanza del residuo solubilizzato che corrisponde al numero di cellule vitali è stato misurato con il lettore Synergy 2 a 570 nm associato al software Gen 5.

2.11. Determinazione dei livelli di cAMP

Le due linee cellulari PNT1A ed LNCaP sono state incubate in piastre contenenti 24 pozzetti ed in ragione di 3×10^5 cellule/pozzetto con medium DMEM ed il rilascio citoplasmatico di cAMP è stato misurato mediante un kit ELISA. Le cellule sono state incubate con 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M di OxA per intervalli di tempo di 30 minuti, 1 e 2 ore. Nel passaggio successivo è stato aggiunto 0.1 M HCl. I lisati

cellulari sono stati centrifugati a 600 giri a temperatura ambiente ed il surnatante è stato utilizzato per la valutazione del rilascio di cAMP.

2.12. Misurazione del Ca^{++} intracitoplasmatico

Le cellule sono state incubate in piastre da 96 pozzetti aventi una concentrazione di 3×10^4 cellule/pozzetto con un medium privo di Ca^{++} e contenente rosso fenolo per 1 ora al buio. Al medium è stata preventivamente aggiunta la sonda fluorescente QF8 ($K_d = 232$ nM) diluita in PBS contenente 0.02 % di acido pluronico F-127 e 0.2 mM di probenecid. Successivamente, le cellule sono state sottoposte a due lavaggi in PBS ed immerse in un medium privo di Ca^{++} contenente OxA alle concentrazioni di 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M. Le piastre sono state poi sottoposte ad una lettura a 514 nm mediante l'utilizzo del lettore di micropiastre Sinergy 2 ed i relativi dati sono stati acquisiti dal software Gen 5. La calibrazione degli esperimenti a fluorescenza è stata effettuata in vitro come descritto nel metodo di Grynkiewicz e collaboratori (1985) secondo cui la concentrazione intracellulare di Ca^{++} è determinata dalla seguente equazione:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(F - F_{min}) / (F_{max} - F)]$$

dove K_d rappresenta la costante di dissociazione apparente della sonda per il Ca^{2+} , F rappresenta la fluorescenza del campione con la sonda per il Ca^{2+} , F_{min} , la fluorescenza del campione senza il legame con il Ca^{2+} ed F_{max} , la fluorescenza del campione saturato con il Ca^{2+} .

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed i dati sono stati espressi come media \pm SEM. La significatività statistica generale è stata valutata mediante il test di Kruskal-Wallis. Il test di Mann-Whitney (a due code) è stato utilizzato per la valutazione dei gruppi trattati paragonati ai relativi controlli.

2.13. Saggio di traslocazione nucleare dei recettori per gli androgeni (AR)

Le cellule carcinomatose LNCaP sono state piastrate in flasks (T25) con densità di 1×10^6 cellule/flask ed incubate per 2 ore con concentrazioni crescenti di OxA in assenza ed in presenza di 0.4 nM di T e successivamente alcune sono state sottoposte per altre 2 ore a trattamento con OxA. Tutte le sostanze sono state diluite in un medium privo di siero che è stato utilizzato come controllo di incubazione cellulare. La concentrazione dell'estratto proteico nucleare è stato valutato mediante la tecnica colorimetrica di Pierce

ed 8 µg di tale estratto per ciascun campione è stato caricato in una apposita piastra. La traslocazione nucleare degli AR è stata valutata mediante metodo ELISA ed i dati sono stati letti a 450 nm mediante un lettore di micropiastra Multiscan Ascent.

Per confermare la significatività dei dati statistici relativi alla traslocazione nucleare degli AR sono stati utilizzati il test per l'analisi della varianza (ANOVA) e quello per confronti multipli di Bonferroni. I valori di P sono stati considerati significativi quando $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) e $P < 0.001$ (***).

3. RISULTATI

3.1. Localizzazione immunoistochimica dell'OX1R nel testicolo del ratto

L'analisi immunoistochimica effettuata sulle sezioni di testicolo di ratto ha rivelato la presenza di citotipi immunoreattivi all'OX1R nel comparto testicolare e non in quello interstiziale. Tale immunoreattività è stata riscontrata negli spermatociti primi in fase di zigotene e pachitene, e negli spermatidi rotondi (immaturi). Gli spermatociti in fase di zigotene (**Tavola 1a,b**) risultano essere disposti in un'unica fila strettamente aderente alla membrana basale che corrisponde alla loro tipica disposizione degli ultimi tre stadi del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale testicolare (dal XII al XIV stadio). Il materiale immunoreattivo ha forma di un piccolo granulo citoplasmatico localizzato in posizione peri-nucleare. Gli spermatociti in fase di pachitene (**Tavola 1c,d**) risultano essere meno abbondanti dei precedenti ed appaiono isolati od in piccoli gruppi costituiti da pochi elementi. Il materiale immunoreattivo ha forma simile a quello descritto per il precedente citotipo ma con intensità di colorazione più ridotta. Gli spermatidi rotondi (**Tavola 1e,f**) presentano immunoreattività all'OX1R a livello acrosomiale, che appare come

una struttura semilunare circondante parte del nucleo. L'intensità delle positività in tale citotipo ed il numero di cellule positive risultano essere maggiori durante il VII e l'VIII stadio del ciclo evolutivo rispetto agli altri.

3.2. Espressione dell'mRNA codificante per l'OX1R e della relativa proteina nel testicolo del ratto

Mediante analisi dell'RT-PCR è stata evidenziata l'espressione dell'mRNA che codifica per il recettore OX1R (**Tavola 2**). In particolare, i prodotti della PCR corrispondenti sono risultati costituiti da 300 coppie di basi (**Tavola 2a, parte superiore, canale 3**) sia nei campioni del testicolo di ratto sia in quelli di cervello di ratto, utilizzati questi ultimi come controllo positivo (**Tavola 2a, parte superiore, canale 2**). Inoltre, dall'amplificazione del cDNA della β -actina è stato ottenuto un trascritto di 469 paia di basi, in tutti i campioni testati (**Tavola 2a, parte inferiore**). Nessun fenomeno di amplificazione è stato riscontrato quando dell'acqua distillata è stata sostituita al cDNA (controllo negativo) (**Tavola 2a, canale 4, parte superiore ed inferiore**).

La presenza dell'OX1R nel testicolo di ratto è stata confermata mediante analisi del Western blotting. In particolare, è stata evidenziata una banda relativa ad una proteina con peso molecolare di circa 50 kDa corrispondente al peso del recettore (**Tavola 2b, blot superiore, canale 2**). La specificità della risposta è stata confermata previa pre-incubazione dell'anticorpo anti-OX1R con il corrispettivo peptide bloccante. In questo caso non è stata evidenziata alcuna banda nei campioni testati (**Tavola 2b, blot superiore, canale 3**), mentre la presenza dell'OX1R è stata confermata nel campione di cervello di ratto (**Tavola 2b, blot superiore, canale 1**). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa, il blot superiore è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (**Tavola 2b, blot inferiore**).

3.3. Effetto dell'OxA e del MIS sulla secrezione di testosterone (T)

Nella presente ricerca è stato, inoltre, comparata l'attività dell'OxA sulla steroidogenesi testicolare con quella del MIS per indagare l'esistenza di eventuali interrelazioni tra le due sostanze. Infatti il MIS notoriamente inibisce la sintesi di T nelle cellule del Leydig fetali,

neonatali e mature del ratto (Teixeira et al., 1999). A tal proposito, 1 nM di OxA o di MIS è stata aggiunta in un mezzo di coltura contenente sezioni tissutali di testicolo di ratto e dopo 6 ore dall'incubazione, è stato osservato che l'OxA determina un incremento della sintesi di T contrariamente al MIS. In particolare, l'OxA eleva il T da 5.54 ± 0.29 a 7.7 ± 0.50 ng/ml ($P < 0.05$), mentre il MIS riduce i livelli di T da 5.54 ± 0.29 a 1.5 ± 0.15 ng/ml ($P < 0.01$). Sono state utilizzate come controllo positivo, sezioni tissutali trattate con LH nelle medesime condizioni sperimentali che ha elevato i livelli di T a 24.32 ± 2.15 ng/ml ($P < 0.01$). In una seconda fase di esperimenti, le sezioni tissutali testicolari sono state dapprima incubate con OxA per 6 ore e successivamente esposte al MIS fino a 12 ore. Il trattamento di 12 ore con OxA da sola ha determinato un incremento del 27% della secrezione di T, mentre l'esposizione combinata OxA + MIS ripristina la secrezione normale dell'ormone, che risulta essere solo di poco più alta rispetto al controllo (**Tavola 3**). L'incubazione delle sezioni con solo MIS ha determinato una riduzione del 70% della secrezione di T dopo 12 ore, mentre l'aggiunta di OxA per un tempo di 6 ore alle sezioni precedentemente trattate con il MIS, ha ridotto del 30 % l'attività inibitoria del MIS sulla produzione di T. Le sezioni di controllo positivo trattate con LH per 12 ore hanno secreto una quantità di T maggiore rispetto agli altri

esperimenti eseguiti (**Tavola 3**). Inoltre, l'aggiunta dell'inibitore specifico dell'OX1R, SB-408124 alle sezioni trattate con OxA, ha determinato un deciso effetto inibitorio della steroidogenesi (**Tavola 3**). Se utilizzato da solo tale inibitore non ha alcun effetto steroidogenico.

3.4. Rilevazione immunoistochimica dell'OxB e dell'OX2R nel testicolo del ratto

L'analisi immunoistochimica delle sezioni trattate con l'OxB, ha mostrato la presenza di materiale immunoreattivo in diversi citotipi testicolari quali gli spermatociti primari in fase di pachitene (**Tavola 4a**) e gli spermatidi nelle diverse fasi maturative: giovanile od immatura (rotondi) (**Tavola 4b**), intermedia (ovali) (**Tavola 4c**) e matura (allungati) (**Tavola 4d**). Il materiale immunoreattivo negli spermatociti in pachitene presenta l'aspetto di un unico granulo, intensamente colorato, localizzato nella porzione più interna del citoplasma, lungo la membrana nucleare. Negli spermatidi rotondi, il materiale positivo all'OxB presenta aspetto di un unico granulo in posizione perinucleare, ma durante la fase maturativa, tale granulo tende a perdere contatto con la membrana nucleare ed a spostarsi

verso la porzione più caudale della cellula, diventata di aspetto ovale e successivamente allungato (**Tavola 4b**). L'immunoreattività all'OxB è stata rinvenuta nella seconda parte del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale testicolare, dal VII al XIV stadio (**Tavola 4e**).

Per dimostrare l'assenza di cross-reazione tra gli anticorpi anti-OxA ed anti-OxB, sono state effettuate colorazioni alternate con i suddetti su sezioni contigue di 3µm di spessore. E' stato dimostrato che i citotipi positivi all'OxB non presentano immunoreattività all'OxA (**Tavola 5a-d**). Come controllo positivo e dell'attività dell'anticorpo anti-OxA è stata scelta un'immagine di cellula del Leydig positiva all'OxA (**Tavola 5e**).

Immunoreattività all'OX2R è stata rinvenuta negli spermatociti primari nella fase di pachitene (**Tavola 6a**) e in quelli secondi (**Tavola 6b**) e negli spermatidi nelle varie fasi maturative, rotonda (**Tavola 6c**), ovale (**Tavola 6d**) ad allungata (**Tavola 6e**). Il materiale immunoreattivo negli spermatociti in pachitene (**Tavola 6a**) ed in quelli secondi (**Tavola 6b**) ha aspetto analogo a quanto descritto per l'OxB. Negli spermatidi rotondi, il materiale positivo all'OX2R appare come un piccolo granulo aderente alla membrana nucleare tra il II ed il V stadio del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale ed assume aspetto semilunare circondante il nucleo negli spermatidi

rotondo/ovalari appartenenti al VI-IX stadio. Dal X stadio in poi, il materiale positivo riassume aspetto rotondeggiante, perde contatto con il nucleo e progressivamente si colloca nella porzione medio-caudale della cellula in fase di allungamento. I citotipi immunoreattivi all'OX2R sono descritti lungo tutto il ciclo maturativo dell'epitelio germinativo testicolare (**Tavola 6f**).

3.5. Espressione dell'mRNA codificante per l'OX2R e della relativa proteina nel testicolo del ratto

Mediante analisi dell'RT-PCR è stata valutata l'espressione dell'mRNA che codifica per l'OX2R nel testicolo di ratto. Il frammento di 459 paia di basi ottenuto è corrispondente a quello per l'OX2R (**Tavola 7, pannello A, canale 2**). Dall'amplificazione del cDNA codificante per la β -actina è stato ottenuto un trascritto di 469 paia di basi. Nessuna amplificazione è stata documentata quando acqua distillata è stata utilizzata al posto del cDNA per realizzare un controllo negativo (**Tavola 7, pannello A, canale 3**).

La presenza dell'OX2R nel testicolo di ratto è stata confermata mediante l'analisi del Western blotting (**Tavola 7**) che ha evidenziato la presenza di una proteina con peso molecolare di 38 kDa

corrispondente all'OX2R (**Tavola 7, pannello B, canale 1**). La specificità della risposta è stata confermata previa pre-incubazione dell'anticorpo anti-OX2R con il peptide bloccante. Tale procedura annulla la formazione di bande proteiche corrispondenti all'OX2R (**Tavola 7, pannello B, canale 2**). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa il blot superiore è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (**Tavola 7, pannello B, parte inferiore**).

3.6. Azione dell'OxB sulla secrezione del testosterone (T) nel testicolo del ratto

Durante gli esperimenti in vitro eseguiti nel corso di tale lavoro, sezioni tissutali di testicolo di ratto sono state incubate con OxA ed OxB allo scopo di dimostrare gli effetti dei peptidi sulla steroidogenesi dopo 12 ore di esposizione. I risultati ottenuti ci hanno consentito di confermare il dato precedente secondo il quale l'OxA stimola la steroidogenesi in modo significativa ($10,4 \pm 0,4$ ng/ml di estratto tissutale rispetto al controllo $*P < 0.05$). Al contrario, la presenza di OxB non altera la produzione di T in modo significativo ($7,5 \pm 0,18$ ng/ml di estratto tissutale). D'altronde, l'effetto

steroidogenico dell'esposizione con LH (500 ng/g di tessuto) per 12 ore, dimostra la vitalità del tessuto ($18,08 \pm 0,2$ ng/ml di estratto tissutale $**P<0.01$) (**Tavola 7, pannello C**).

3.7. Effetto dell'OxB sulla de-fosforilazione dell'ERK 1/2 mediato dall'OX2R

Per valutare l'esistenza di una possibile azione metabolica svolta dall'OxB nel testicolo del ratto, è stato studiato l'andamento della fosforilazione dell'ERK1/2 in seguito ad esposizioni con OxB. A tal proposito è stato eseguito un immunoblotting su campioni di testicolo di ratto previamente trattati con 1 nM di OxB che ha mostrato una riduzione della fosforilazione dell'ERK1/2 (**Tavola 7, pannello D, canali 4-6**) se paragonata a quella dei controlli non trattati (**Tavola 7, pannello D, canali 1-3**). Al contrario, quando i campioni venivano incubati contemporaneamente con OxB e l'inibitore del recettore 2 TCSOX2 29, non è stata evidenziata riduzione di fosforilazione dell'ERK (**Tavola 7, pannello D, canali 7-9**).

3.8. Localizzazione dell'OxA e dell'OX1R nel testicolo dell'alpaca

L'analisi immunoistochimica effettuata su sezioni di testicolo di alpaca ha evidenziato la presenza di materiale immunoreattivo all'OxA nelle cellule del Leydig e del Sertoli, negli spermatogoni, negli spermatociti in fase di preleptotene (resting) e negli spermatidi rotondi ed ovali. Le positività appaiono di aspetto granulare ed a localizzazione citoplasmatica. Le cellule del Leydig positiva all'OxA (**Tavola 8a**) sono numerose, presentano aspetto rotondo/ovale e sono organizzate in piccoli gruppi caratterizzati da elementi cellulari a varia intensità di colorazione. Le positività delle cellule del Sertoli (**Tavola 8b**) hanno forma di piccoli granuli scarsamente positivi. Gli spermatogoni dell'alpaca presentano aspetto rotondo od ovale, ma solo la seconda tipologia è positiva all'OxA e tale positività ha forma granuli immunoreattivi collocati ad una delle estremità citoplasmatiche (**Tavola 8c**). Gli spermatociti in preleptotene presentano aspetto rotondeggiante e sono collocati lungo la membrana basale (**Tavola 8d**). Il materiale positivo appare di aspetto granulare ed è localizzato in posizione peri-nucleare. Negli spermatidi il materiale reattivo è sempre contenuto a livello acrosomiale ed assume l'aspetto e la localizzazione di quest'ultimo durante il ciclo evolutivo.

Gli spermatidi rotondi, infatti, mostrano positività di forma semilunare e posizione peri-nucleare (**Tavola 8e**), che progressivamente divengono puntiformi e periferiche negli spermatidi ovali (**Tavola 8f**).

I citotipi immunoreattivi all'OX1R sono rappresentati dalle cellule del Leydig, (**Tavola 9a,b**) e dagli spermatidi rotondi (**Tavola 9c**), ovali (**Tavola 9d**) ed allungati (**Tavola 9e**). Il numero, l'aspetto e l'intensità delle positività trovate nei sopra menzionati citotipi appare sovrapponibile a quanto descritto per le rispettive cellule contenenti OxA.

3.9. Espressione della prepro-orexina e dell'OX1R negli estratti tissutali del testicolo di alpaca

Allo scopo di confermare i dati immunoistochimici, è stata eseguita la tecnica del western blotting su estratti tissutali di testicolo di alpaca. È stato scelto come controllo positivo un campione di cervello di ratto. Gli anticorpi anti-prepro-orexina ed anti-OX1R riconoscono due proteine tissutali e formano con esse bande proteiche aventi un peso molecolare di 16 e 55 kDa. Tali pesi molecolari corrispondono a

quelli noti per la prepro-orexina e per l'OX1R, come mostrato nella

Tavola 10.

3.10. Effetto in vitro dell'OxA e del MIS sulla steroidogenesi dell'alpaca

Gli esperimenti in vitro ci hanno consentito di confermare i dati sopra descritti per il testicolo del ratto riguardanti l'effetto dell'OxA e del MIS sulla steroidogenesi nell'alpaca. In un primo esperimento, le sezioni tissutali sono state incubate con 1nM di OxA, da sola o contemporaneamente a 1.7 μ mol di SB-408124, per un intervallo di tempo da 0 a 180 minuti (**Tavola 11**). L'OxA stimola la secrezione basale di T già dopo 90 minuti di esposizione mentre l'azione singola dell'antagonista non manifesta alcun effetto. Dopo 180 minuti i dati precedenti sono stati confermati e la coesistenza dell'antagonista con il peptide riduce gli effetti di quest'ultimo ($p < 0.01$ rispetto all'OxA da sola). Un secondo esperimento (**Tavola 12**) è stato eseguito incubando le sezioni tissutali con 1nM di OxA o 1nM di MIS per 6 e 12 ore. Alcune sezioni, dopo un iniziale trattamento con ognuno dei peptidi per 6 ore, vengono incubate con le stesse quantità dei peptidi rispettivamente, opposti per le rimanenti 6 ore. L'OxA stimola la

secrezione di T a 6 e 12 ore ($p<0.05$ rispetto al controllo, rispettivamente). Al contrario, il MIS riduce la steroidogenesi agli stessi tempi di esposizione ($p<0.05$ e $p<0.01$ rispetto al controllo, rispettivamente). L'aggiunta di MIS alle sezioni precedentemente incubate con OxA riduce l'effetto steroidogenico indotto dall'OxA ($p<0.01$ rispetto all'OxA da sola). In modo analogo, l'aggiunta di OxA alle sezioni precedentemente incubate con il MIS riduce parzialmente l'effetto steroidolitico svolto da esso ($p<0.01$ rispetto al MIS da solo). La vitalità dei tessuti è stata valutata mediante stimolazione con LH (500 ng/g di tessuto) a 90, 180, 360 e 720 minuti. Come mostrato nella **Tavola 13**, la produzione di T per g di tessuto è statisticamente significativa in ogni fase dell'esperimento.

3.11. Valutazione immunoistochimica dell'OxB e dell'OX2R nel testicolo dell'alpaca

I citotipi immunoreattivi all'OxB sono gli spermatogoni con aspetto ellittico (**Tavola 14a**), gli spermatociti in fase di preleptotene (resting) (**Tavola 14b**), zigotene (**Tavola 14c**) e pachitene (**Tavola 14d**) e gli spermatidi durante le diverse fasi evolutive, rotondi (immaturi) (**Tavola 14e**) ed allungati (maturi) (**Tavola 14f**). L'aspetto delle

positività nei diversi citotipi tubulari è analogo a quanto descritto negli esperimenti precedenti, condotti con l'anticorpo anti-OxA.

Per dimostrare l'assenza di cross-reattività tra gli anticorpi anti-OxA ed anti-OxB, sono state utilizzate sezioni contigue di 3 µm di spessore, colorate alternativamente con i due anticorpi monoclonali. I risultati hanno mostrato che le due immunoreattività non coesistono mai (**Tavola 15a-d**).

L'immunoreattività all'OX2R è stata descritta nelle cellule del Leydig, distribuite in piccoli gruppi e aventi diversa intensità di positività (**Tavola 16a**) e negli spermatidi rotondi (immaturi) (**Tavola 16b**) ed allungati (maturi) (**Tavola 16c**).

3.12. Espressione dell'OX2R in estratti tissutali del testicolo di alpaca

La presenza del peptide OX2R è stata confermata mediante la tecnica del western blotting. È stato scelto come controllo positivo un campione di cervello di ratto (**Tavola 17, canale 2**). Gli estratti tissutali contengono un peptide agganciato dall'anti-OX2R ed insieme formano una banda proteica avente un peso molecolare di 40 kDa

(**Tavola 17, canale 1**). Il peso molecolare individuato corrisponde a quello noto per l'OX2R.

3.13. Valutazione immunoistochimica dell'OxA e dell'OX1R nell'epididimo dell'alpaca

Nell'epididimo dell'alpaca materiale positivo all'OxA (**Tavola 18a-d**) ed all'OX1R (**Tavola 18e-f**) è stato descritto nelle cellule principali della testa del suddetto organo. L'aspetto di tali positività appare finemente granulare e localizzato nella porzione sopranucleare del citoplasma (**Tavola 18a,b,e,f**). Gruppi di granuli reattivi all'OxA sono persistenti anche nella porzione infranucleare (**Tavola 18c**). La localizzazione delle cellule positive nell'ambito dell'epididimo è zonale in quanto presente solo in alcune aree ed assente in altre. Nelle aree di ampia diffusione, le cellule positive rivestono quasi per intero il profilo circolare dei tubuli e tale sequenza appare solo raramente interrotta da elementi negativi. Gli altri citotipi epididimali sono risultati negativi. La **Tavola 18d**, mostra il citoplasma di due citotipi definiti “cellule basali” ed “apical mithochondrial rich” cells che appaiono chiaramente negativi. Quest'ultimo citotipo è stato descritto qualche tempo fa nel ratto (Brown e Montesano, 1980), nell'uomo

(Regadera et al., 1993) e solo recentemente nell'alpaca (Parillo et al., 2009).

3.14. Espressione della prepro-orexina e dell'OX1R in estratti tissutali di epididimo di alpaca

La presenza della prepro-orexina e dell'OX1R nella testa dell'epididimo è stata confermata mediante la tecnica del western blotting. Gli estratti tissutali di epididimo di alpaca contengono due proteine aventi un peso molecolare di 16 e 50 kDa, rispettivamente (**Tavola 19**). Tali valori corrispondono a quelli della prepro-orexina e dell'OX1R e sono stati individuati anche negli omogenati di cervello di ratto qui utilizzati come controlli positivi. La specificità della risposta è stata controllata mediante pre-incubazione degli anticorpi anti-prepro-orexina ed anti-OX1R con i relativi peptidi. Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa il blot è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (**Tavola 19**).

3.15. Localizzazione immunoistochimica dell'OxA e dell'OX1R nella prostata normale ed iperplastica

Immunoreattività all'OxA ed all'OX1R è stata riscontrata nell'epitelio follicolare esocrino della prostata umana normale (**Tavola 20**) ed iperplastica (**Tavola 21**). Le aree positive ai peptidi presentano distribuzione focale in quanto esse sono chiaramente intervallate da zone più ampie dell'epitelio che risultano negative. Il materiale immunoreattivo appare sotto forma di gruppi di piccoli granuli più o meno estesi nel citoplasma (**Tavola 20A**). Tale materiale è contenuto nelle porzioni apicali e basali delle cellule follicolari e talvolta forma ad aree di intensa positività (**Tavole 20A,C e D, e 21A-D**). In tali aree di maggiore replezione, le cellule completamente positive si localizzano prevalentemente nella porzione basale dell'epitelio stratificato e solo raramente a livello apicale (**Tavole 20B-D e 21D**).

Sebbene non sia stata effettuata un'analisi quantitativa, dall'osservazione di un numero congruo di sezioni è stato dedotto che l'immunoreattività ad entrambi i peptidi risulta essere maggiore nella prostata iperplastica rispetto a quella normale.

3.16. Espressione dell'mRNA codificante per la prepro-orexina e per l'OX1R e presenza delle relative proteine nella prostata normale ed iperplastica

L'espressione degli mRNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R nella prostata normale ed iperplastica è stata analizzata mediante la tecnica dell'RT-PCR. Frammenti di 576 paia di basi, per la prepro-orexina, e di 463 paia di basi, per l'OX1R, sono stati ottenuti sia nella prostata normale (**Tavola 22, pannello A, canale 3**) che in quella iperplastica (**Tavola 22, pannello A, canale 4**).

Inoltre, dall'amplificazione del cDNA della β -actina è stato ottenuto un trascritto di 469 paia di basi, in tutti i campioni testati (**Tavola 22, pannello A, canali 2-4, parte inferiore**). Nessun fenomeno di amplificazione è stato riscontrato quando acqua distillata è stata sostituita al cDNA come esperimento di controllo negativo (**Tavola 22, pannello A, canale 5**), mentre l'espressione dei frammenti di DNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R è presente nell'omogenato di cervello di ratto utilizzato come controllo positivo (**Tavola 22, pannello A, canale 2**).

La presenza della prepro-orexina e dell'OX1R nella prostata normale ed iperplastica è stata confermata mediante le tecnica del western

blotting. I peptidi rilevati nella prostata normale (**Tavola 22, pannello B, canale 2**) ed iperplastica (**Tavola 22, pannello B, canale 3**) presentano un peso molecolare di 16 e 50 kDa, rispettivamente sia. La specificità della risposta è stata confermata incubando gli anticorpi anti-prepro-orexina ed anti-OX1R con i rispettivi peptidi. L'esito di tale esperimento è sempre negativo (**Tavola 22, pannello B, canale 4**), mentre positiva risulta la presenza di ambo i peptidi testata in campioni di cervello di ratto (**Tavola 22, pannello B, canale 1**). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa il blot superiore è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (**Tavola 22, pannello B, parte inferiore**).

3.17. Presenza dell'OX1R nella linea cellulare prostatica normale PNT1A

La presenza dell'OX1R è stata inoltre indagata nella linea cellulare prostatica umana PNT1A. A tale scopo campioni da colture cellulari sono stati sottoposti ad elettroforesi SDS-page e western blotting. Quest'ultimo ha evidenziato una banda proteica di 50 kDa corrispondente al peso molecolare dell'OX1R (**Tavola 22, pannello**

C, canale 2). La specificità della risposta è stata confermata mediante pre-incubazione dell'anticorpo anti-OX1R con il rispettivo peptide che non ha evidenziato alcuna banda relativa (**Tavola 22, pannello C, canale 3**), mentre la presenza del peptide è stata tracciata nei campioni di cervello di ratto usati come controlli positivi (**Tavola 22, pannello C, canale 1**). Il blot è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina al fine di dimostrare che la quantità di proteine caricata è analoga in tutti i canali (**Tavola 22, pannello C, canali 1-3, parte inferiore**).

3.18. Ruolo dell'OxA sulla proliferazione, produzione di cAMP e rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico in cellule PNT1A

I risultati del saggio MTT di proliferazione cellulare mostra che l'OxA, alle dosi di 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M, non ha effetto sulla proliferazione della linea cellulare PNT1A dopo 24 ore di esposizione con il peptide (**Tavola 23, pannello A**).

Allo scopo di valutare l'attività dell'OxA sul metabolismo cellulare è stata effettuata una misurazione dei livelli di cAMP su lisato ottenuto da cellule trattate con differenti concentrazioni di OxA ed a tre

differenti tempi di esposizione al peptide. I risultati hanno dimostrato che l'OxA stimola il rilascio di cAMP (**Tavola 23, pannello B**) dopo 30 minuti di esposizione all'OxA alla dose di 10^{-6} M. Effetti positivi ma inferiori sono stati ottenuti alla dose di 10^{-8} M di OxA dopo 1 ora mentre gli effetti maggiori sono stati osservati dopo 2 ore di esposizione a 10^{-7} M di OxA.

Allo scopo di valutare l'azione dell'OxA sul rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico, la linea cellulare PNT1A, precedentemente marcata con la sonda QF8 fluorescente al Ca^{++} , è stata trattata con differenti concentrazioni di OxA. I risultati di tale studio ci hanno consentito di dimostrare che la più elevata concentrazione del peptide (10^{-6}) è responsabile di un incremento del rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico 26 volte più elevato rispetto al controllo e 7 volte più elevato rispetto a quello liberato dalla medesima concentrazione di carbacholo che è un noto induttore di rilascio di Ca^{++} (**Tavola 23, pannello C**).

3.19. Valutazione immunoistochimica dell'OxA e dell'OX1R nel carcinoma prostatico umano

L'analisi immunoistochimica di sezioni di prostata carcinomatosa ha messo in evidenza la presenza di materiale immunoreattivo all'OxA ed all'OX1R. In particolare il materiale immunoreattivo all'OxA appare finemente granulare e localizzato nel citoplasma di cellule raggruppate in piccole aree intervallate da zone prive di immunopositività (**Tavola 24**). Tali granuli tendono a raggrupparsi progressivamente fino a riempire, in alcuni casi, totalmente il citoplasma (**Tavola 24a,c**). Le cellule prostatiche più intensamente colorate appaiono isolate oppure localizzate in piccoli gruppi (**Tavola 24b**), o, talvolta allineate lungo il profilo circolare di alcune strutture ancora morfologicamente riconoscibili come follicoli ghiandolari (**Tavola 24a,d**).

Il materiale immunoreattivo per OX1R presenta analoga distribuzione di quello positivo per l'OxA (**Tavola 25a-d**). La presenza di ambo i peptidi è stata riscontrata in sezioni di cancro prostatico esprimenti basso, intermedio ed alto grado di malignità secondo la valutazione di Gleason.

3.20. Espressione dell'mRNA codificante per la prepro-orexina e per l'OX1R e delle relative proteine nel carcinoma prostatico

L'espressione degli mRNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R nei tessuti di carcinoma prostatico è stata analizzata mediante la tecnica dell'RT-PCR. Il prodotto di PCR corrispondente è risultato costituito da un frammento di 393 paia di basi per la prepro-orexina e di 356 paia di basi per l'OX1R in tutti i campioni prelevati (**Tavola 26, pannello A, canale 3**).

Inoltre, dall'amplificazione del cDNA della β -actina è stato ottenuto un trascritto di 469 paia di basi, in tutti i campioni testati (**Tavola 26, pannello A, canali 2-3, parte inferiore**). Nessun fenomeno di amplificazione è stato riscontrato quando acqua distillata è stata sostituita al cDNA per effettuare un controllo negativo (**Tavola 26, pannello A, canale 4**), mentre l'espressione dei frammenti di DNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R è stata evidenziata nell'omogenato di cervello di ratto utilizzato come controllo positivo (**Tavola 26, pannello A, canale 2**).

La presenza della prepro-orexina e dell'OX1R nella prostata neoplastica è stata confermata mediante la tecnica del western

blotting. I peptidi rilevati presentano un peso molecolare di 16 kDa, corrispondente a quello della prepro-orexina (**Tavola 26, pannello B, canale 2, blot superiore**) e di 50 kDa, corrispondente a quello dell'OX1R (**Tavola 26, pannello B, canale 3, blot intermedio**). La specificità della risposta è stata confermata mediante la pre-incubazione degli anticorpi anti-prepro-orexina ed anti-OX1R con i rispettivi peptidi che ha evidenziato alcuna banda (**Tavola 26, pannello B, canale 3**), mentre la presenza di ambo i peptidi è stata dimostrata nei campioni di cervello di ratto utilizzato come controllo positivo (**Tavola 26, pannello B, canale 1**). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa, i blots superiori sono stati strippati e reincubati con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (**Tavola 26, pannello B, parte inferiore**).

3.21. Espressione dell'OX1R nella linea cellulare carcinomatosa LNCaP

La tecnica del real-time PCR è stata utilizzata per indagare l'espressione dell'mRNA codificante per l'OX1R in cellule native o previamente trattate con OxA (10^{-7} M) per due ore. I risultati evidenziano che il gene codificante per l'OX1R è normalmente

espresso nella linea cellulare LNCaP anche se i valori dell'mRNA per l'OX1R sono ridotti (valore C_t significativo 34,23917). Questi ultimi, però aumentano significativamente se le cellule vengono previamente stimulate dalla presenza di OxA (**Tavola 26, pannello C**).

3.22. Ruolo dell'OxA sulla proliferazione cellulare, produzione di cAMP e secrezione del Ca^{++} intracitoplasmatico in cellule LNCaP

Viene innanzitutto indagato un eventuale effetto proliferativo (o anti-proliferativo) dell'OxA sulla linea cellulare carcinomatosa LNCaP. Essa è stata sottoposta a trattamento con OxA a concentrazioni scalari (da 10^{-8} a 10^{-6} M) mentre le cellule controllo sono state trattate semplicemente con il medium privo del peptide. Dopo 24 ore è stato valutato il numero di cellule viventi mediante il metodo di esclusione Trypan blue e mediante il saggio MTT. Entrambe le procedure hanno dimostrato che l'OxA, alle diverse concentrazioni usate, determina una riduzione statisticamente significativa, della crescita cellulare rispetto ai controlli (**Tavola 27, pannello A**).

Un altro esperimento eseguito sulla linea cellulare carcinomatosa LNCaP ha riguardato il ruolo dell'OxA sul rilascio di Ca^{++}

intracitoplasmatico. A tale scopo le cellule, precedentemente marcate con la sonda QF8 fluorescente al Ca^{++} , sono state trattate con diverse concentrazioni di OxA che hanno determinato un incremento del rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico significativo. In particolare, la concentrazione più bassa di OxA (10^{-8}M) ha causato un incremento di 2.25 volte più elevato rispetto ai controlli (**Tavola 27, pannello B**) mentre la concentrazione fisiologica dell'OxA (10^{-7} M) ha causato l'incremento di Ca^{++} più rilevante.

Un'ulteriore indagine ha riguardato la valutazione dei livelli di cAMP nel lisato di cellule LNCaP trattate con diverse concentrazioni di OxA a differenti intervalli di tempo. L'OxA alla concentrazione di 10^{-7} e 10^{-6} M determina un incremento di cAMP statisticamente significativo dopo 2 ore di esposizione al peptide se comparato a quello dei controlli non trattati (**Tavola 27, pannello C**).

3.23. Effetto dell'OxA sulla traslocazione nucleare dei recettori per gli androgeni (AR) nella linea cellulare LNCaP

Nell'ambito di tale studio è stato infine indagato il ruolo dell'OxA sulla traslocazione nucleare dei recettori per gli AR nella linea

cellulare LNCaP, sia in presenza che in assenza di T esogeno. A tal scopo, le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di OxA per un tempo di 30 minuti seguito da 2 ore di trattamento con il solo peptide con T alla concentrazione di 0.4 nM. Come già esposto le proteine nucleari sono state estratte e la traslocazione nucleare degli AR è stata misurata mediante saggio ELISA.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'OxA da sola, in intervallo di concentrazione tra 10^{-10} a 10^{-6} M, non manifesta effetto sulla traslocazione nucleare degli AR (**Tavola 28**). Al contrario, la presenza concomitante di T induce una drastica riduzione della traslocazione degli AR.

4.TAVOLE

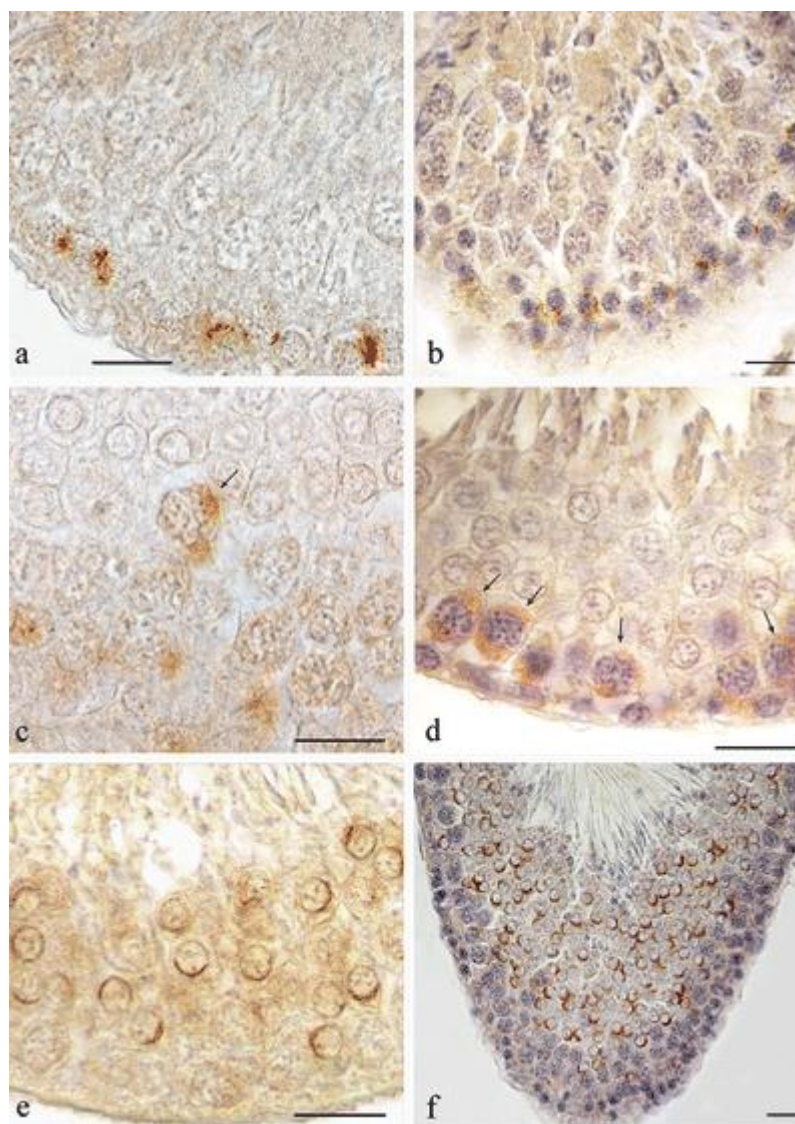


Tavola 1

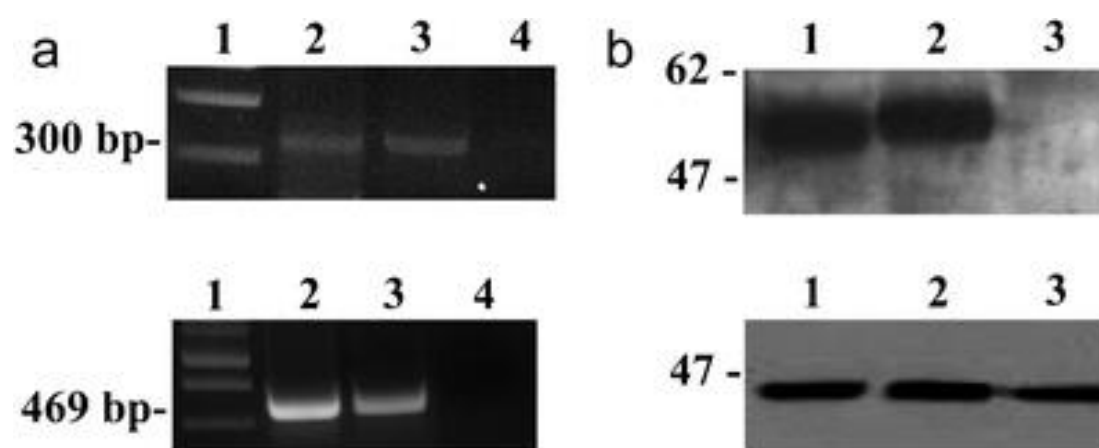


Tavola 2

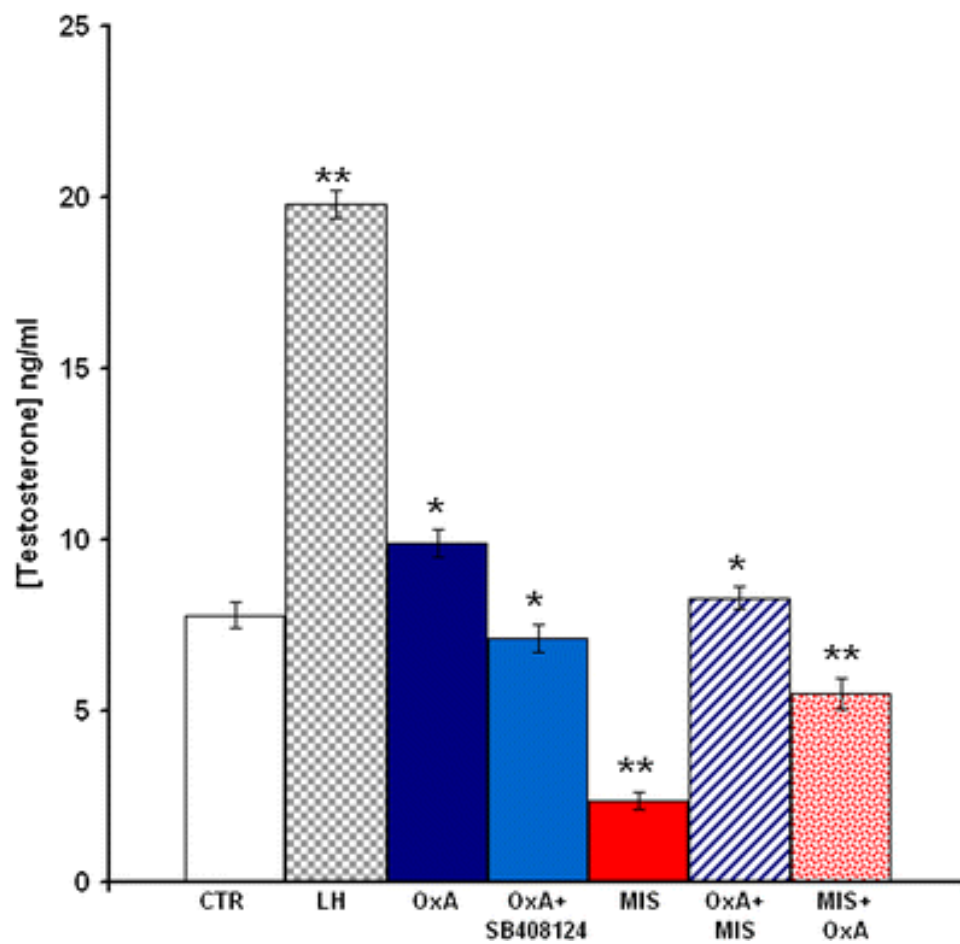


Tavola 3

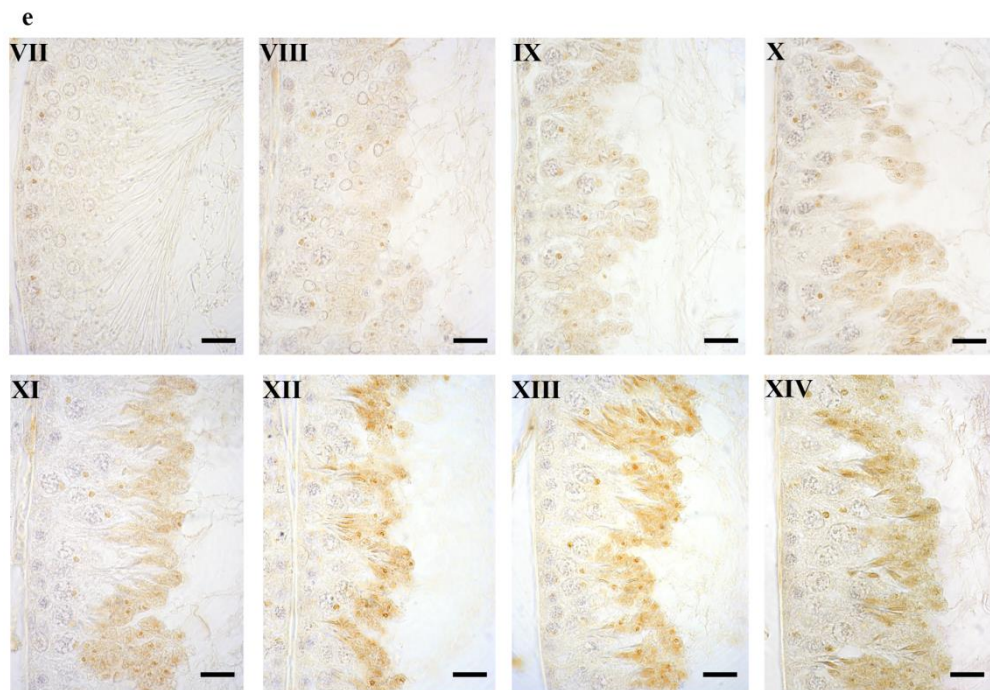
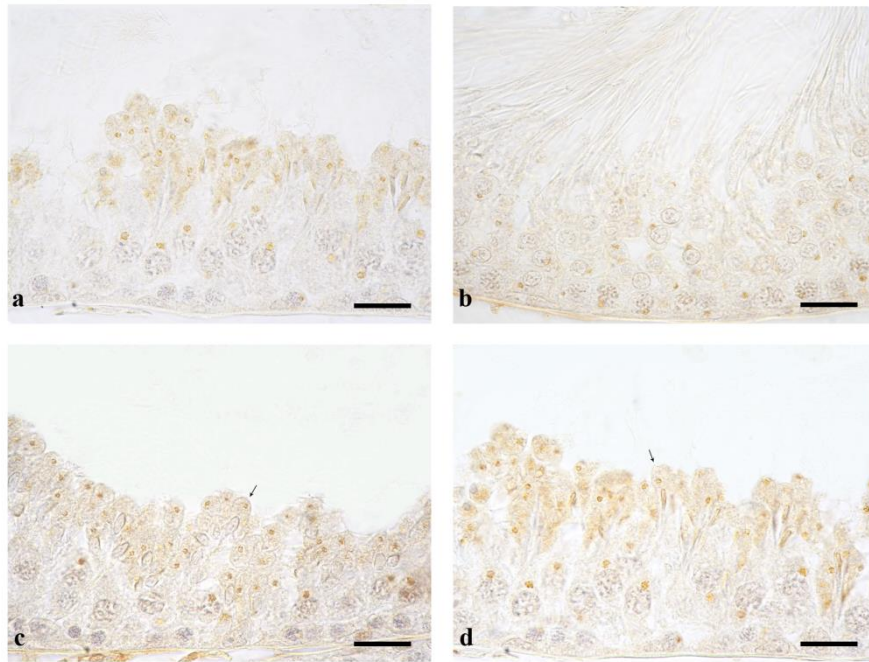


Tavola 4

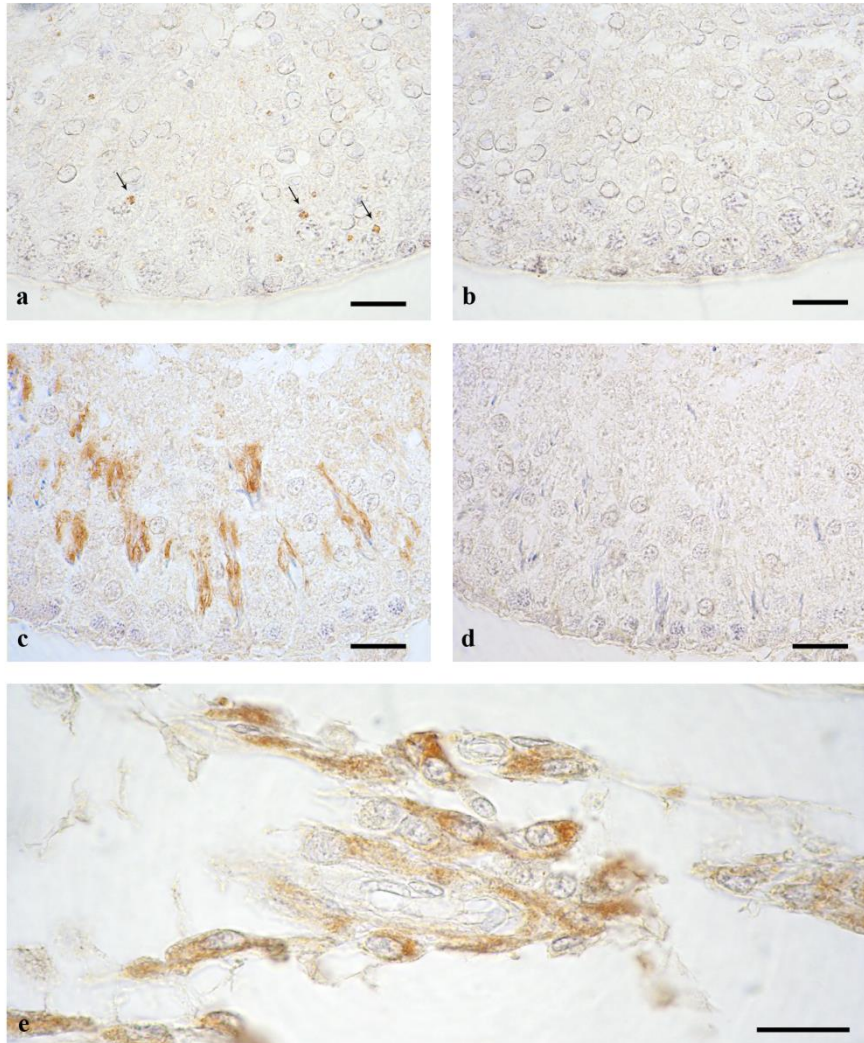


Tavola 5

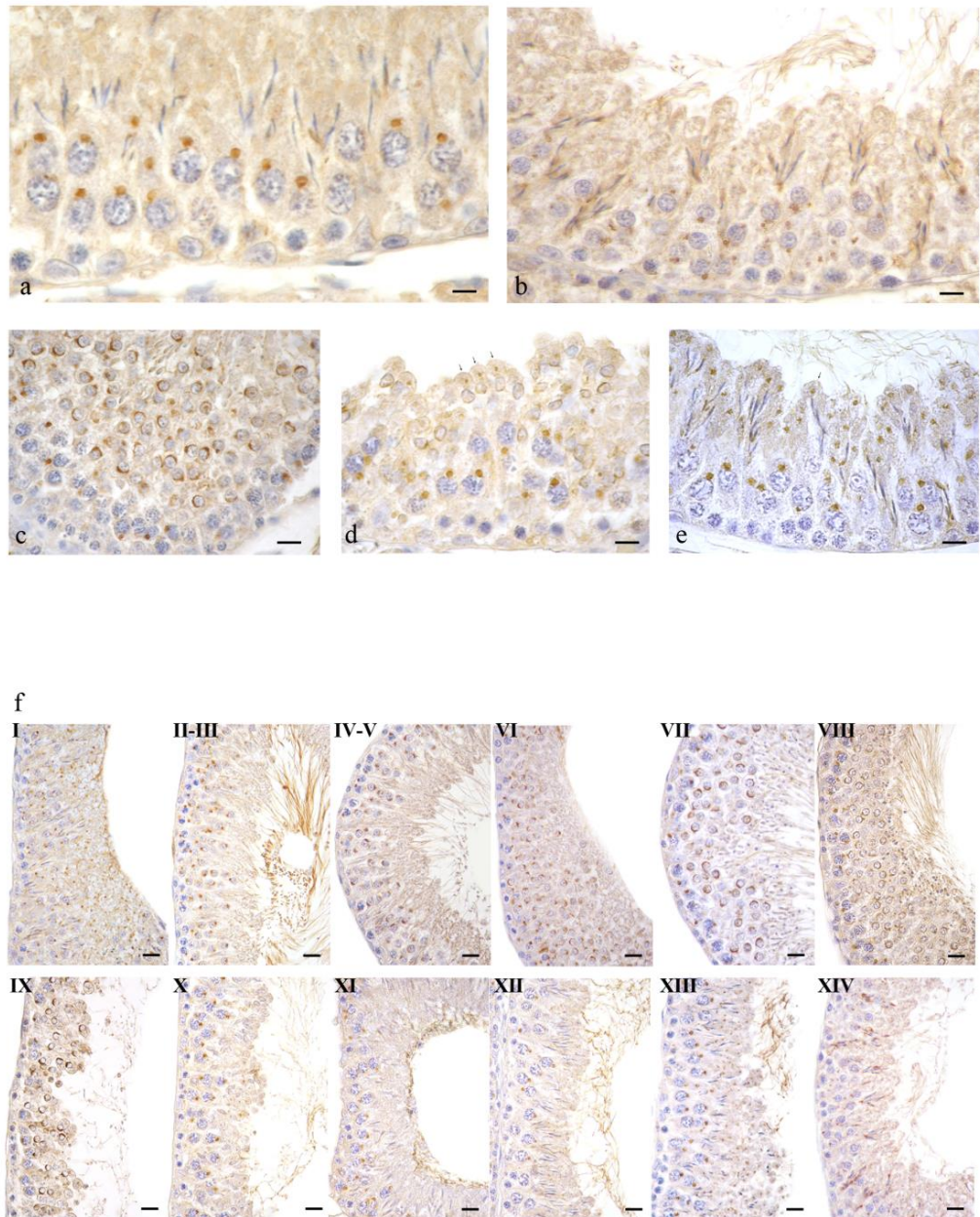


Tavola 6

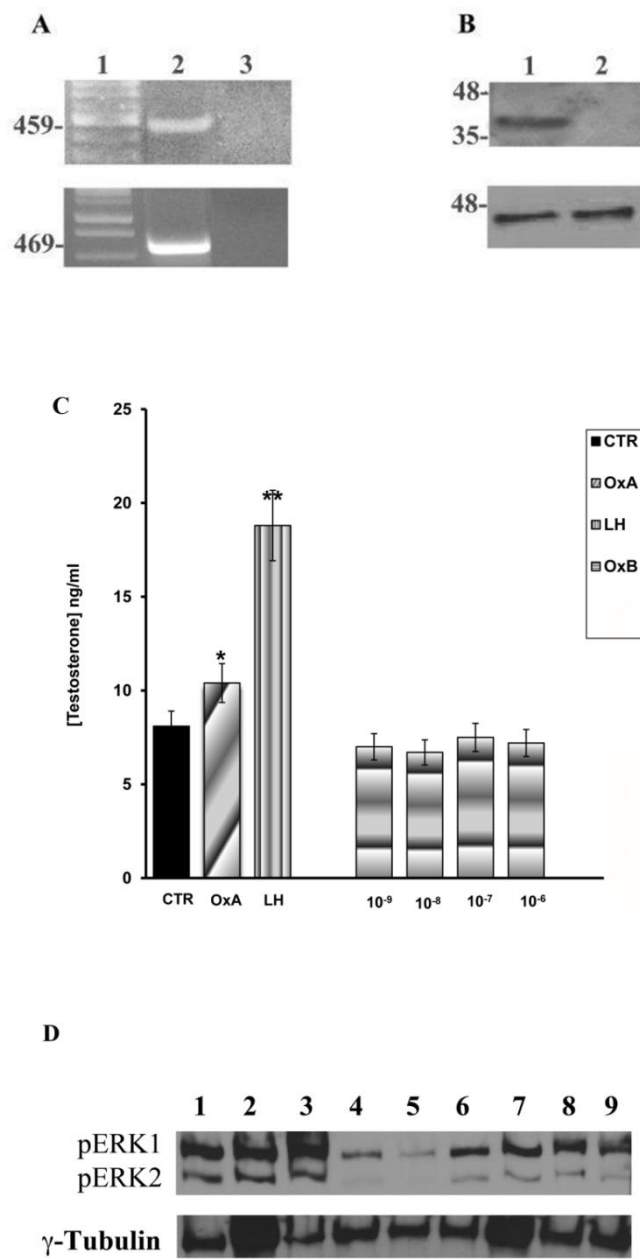


Tavola 7

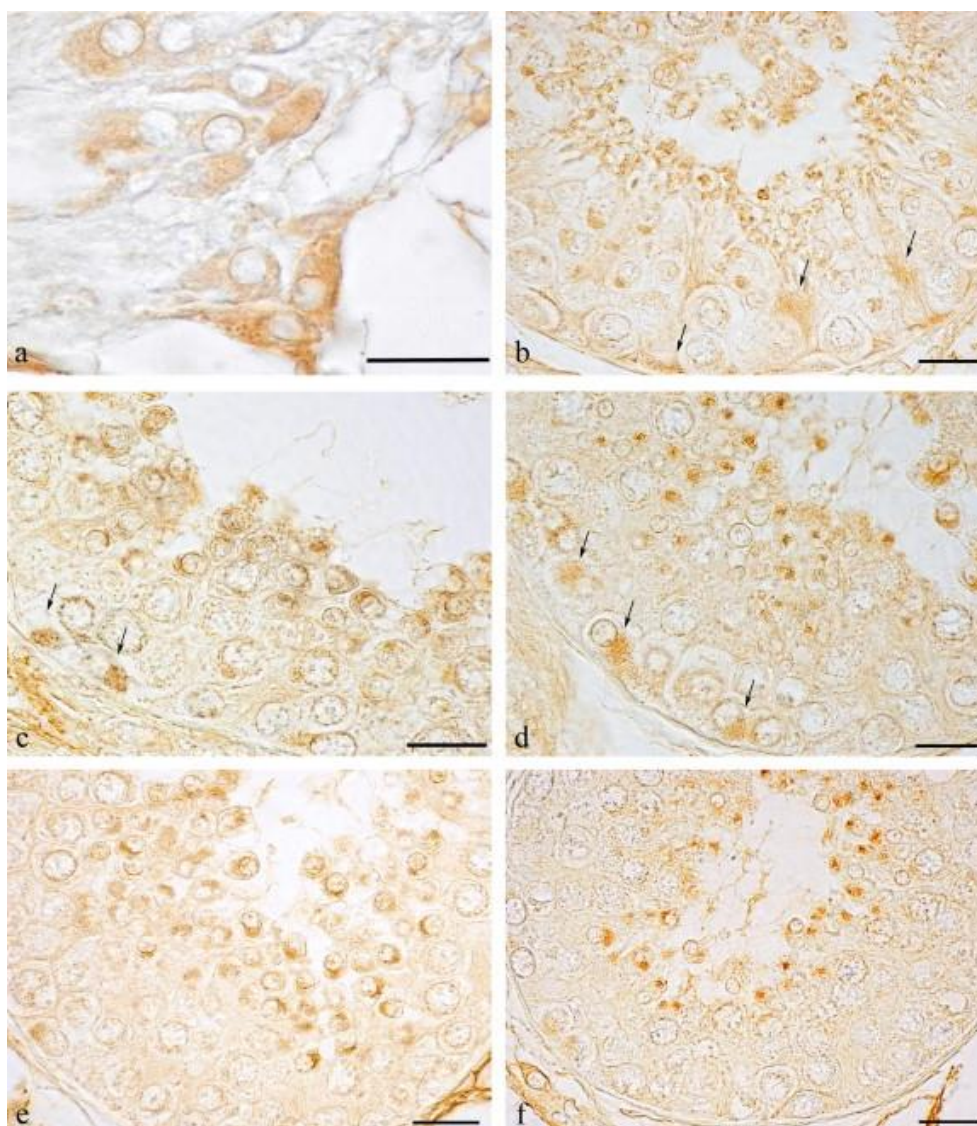


Tavola 8

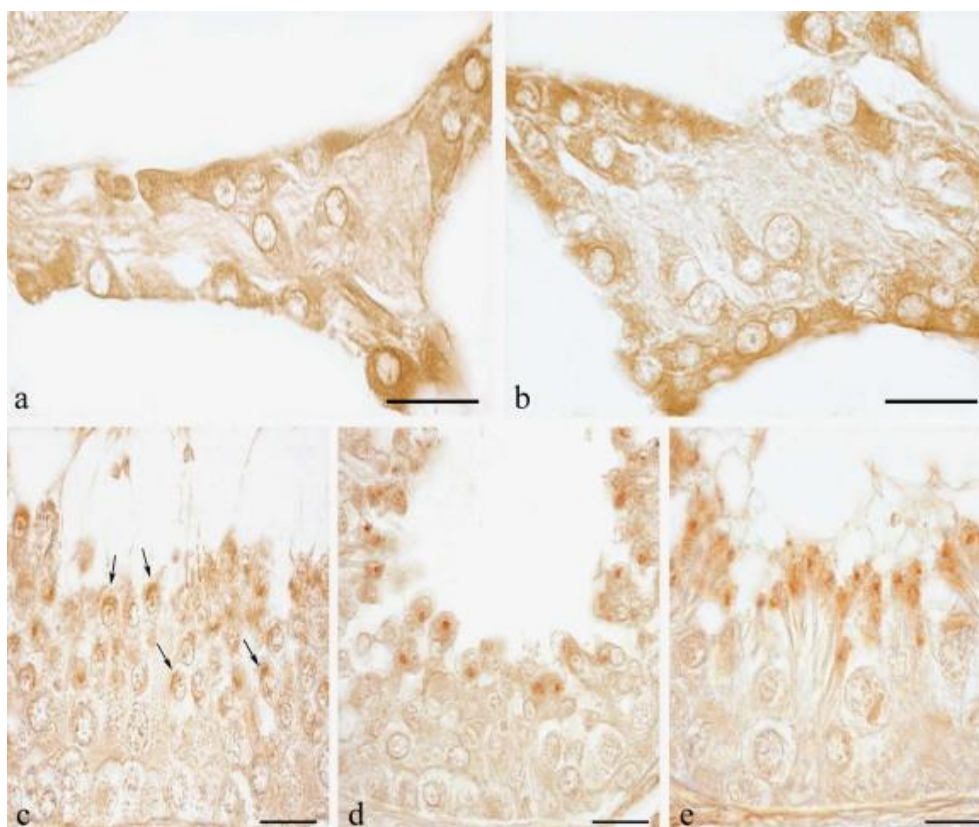


Tavola 9

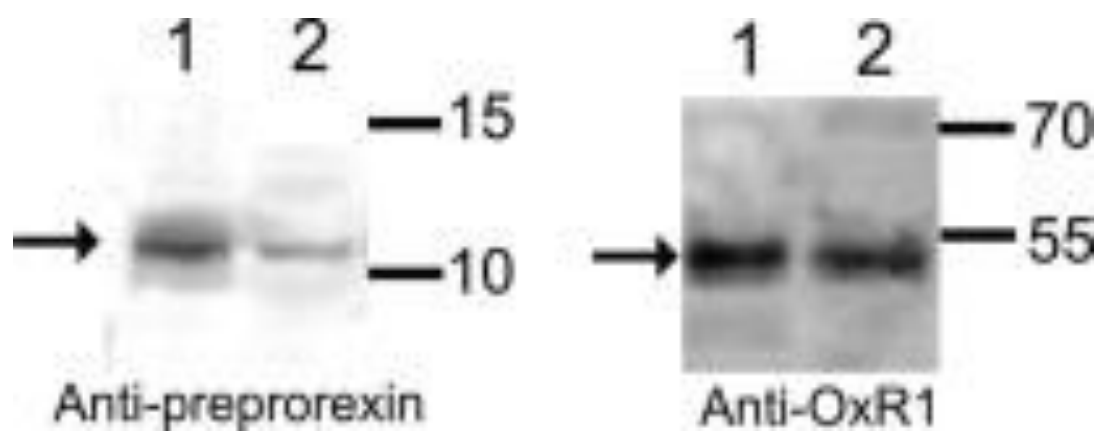


Tavola 10

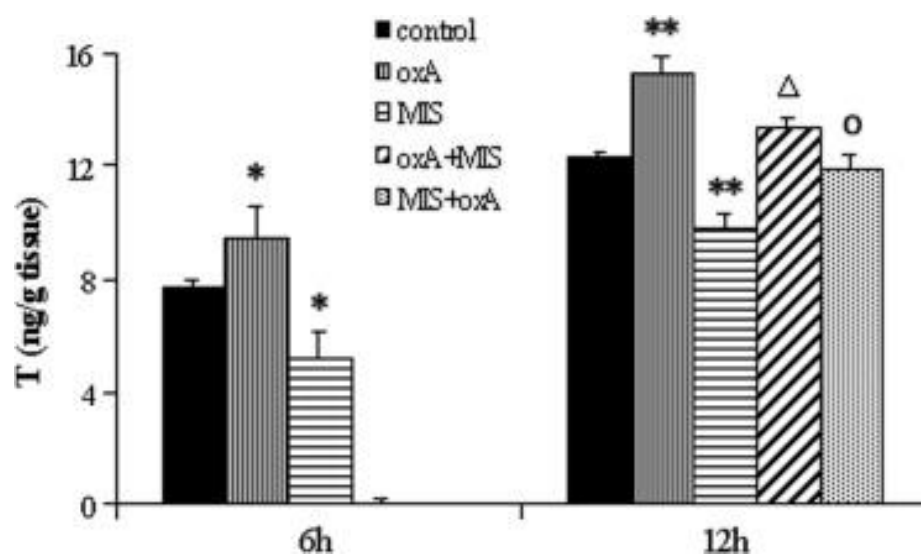


Tavola 11

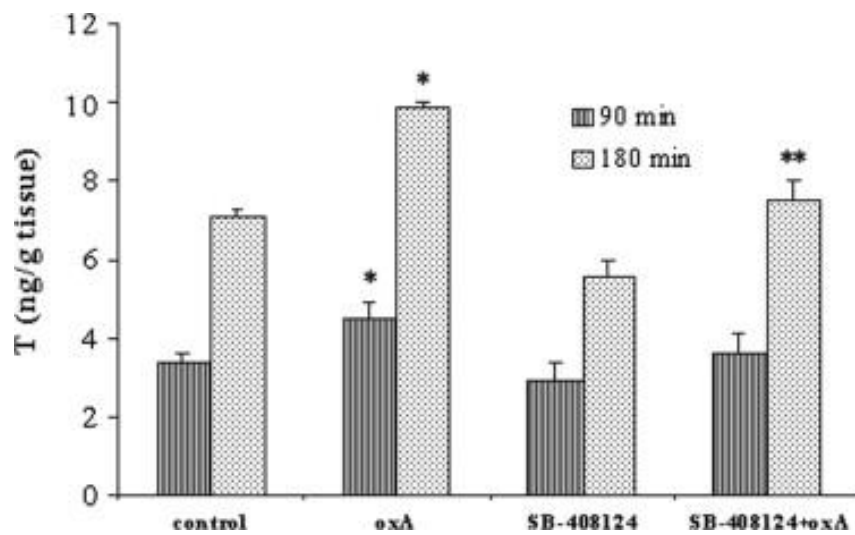


Tavola 12

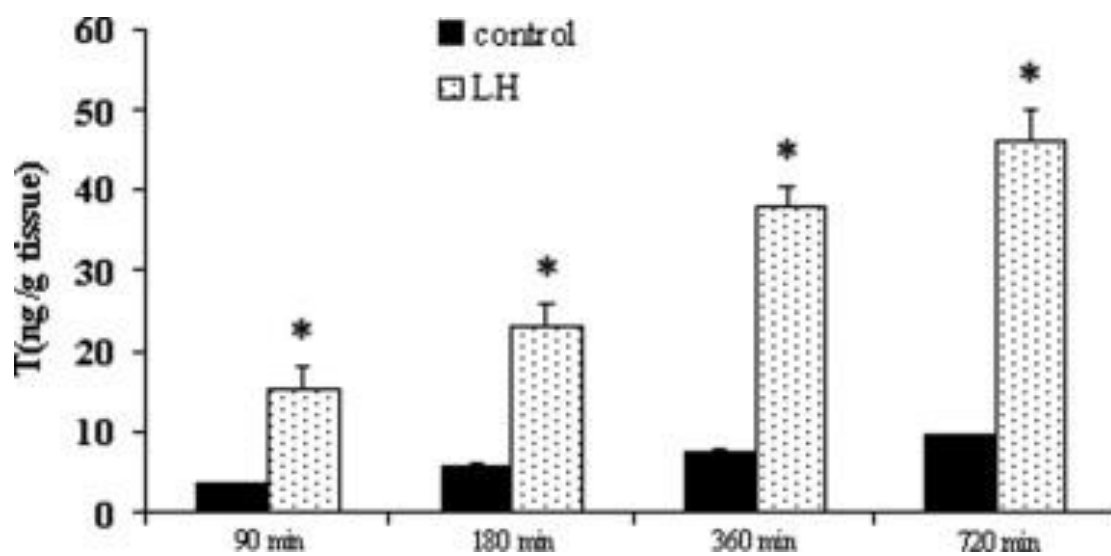


Tavola 13

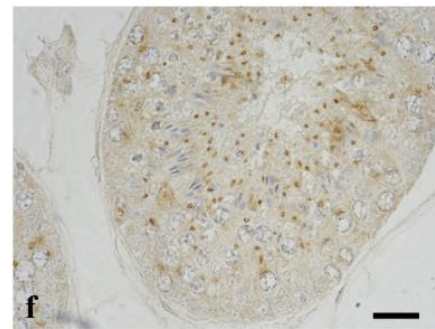
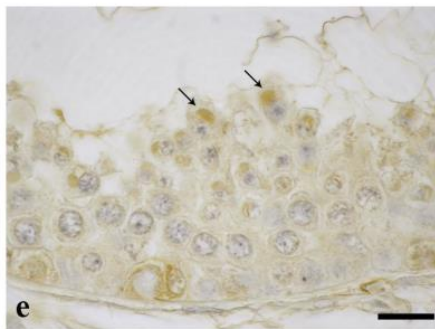
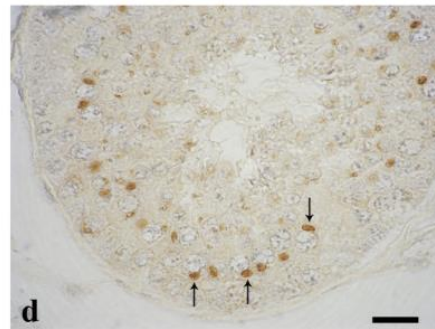
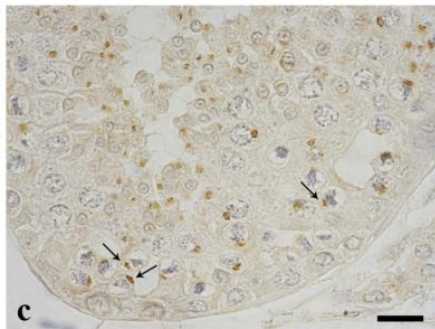
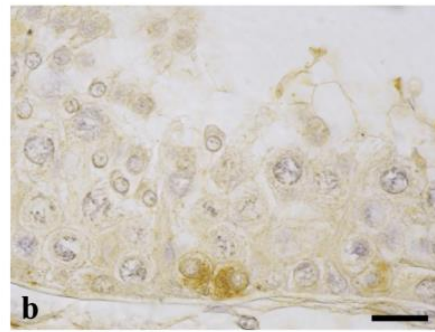
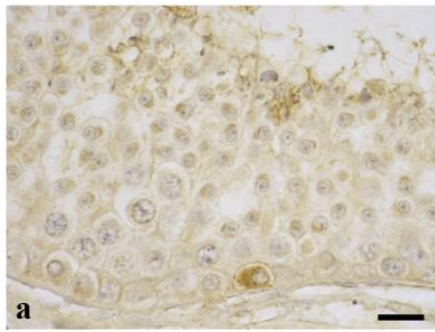


Tavola 14

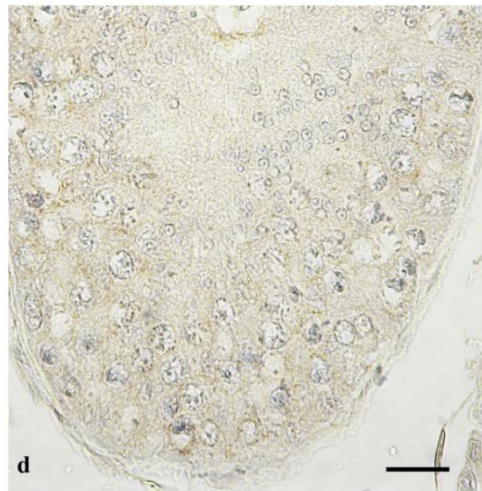
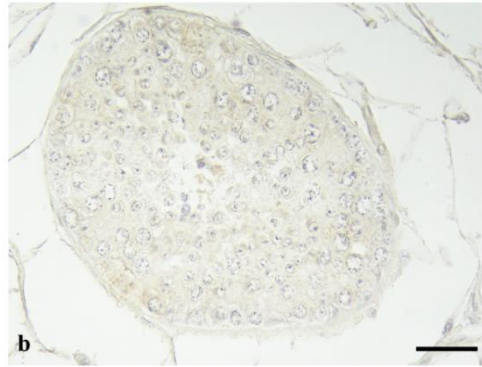
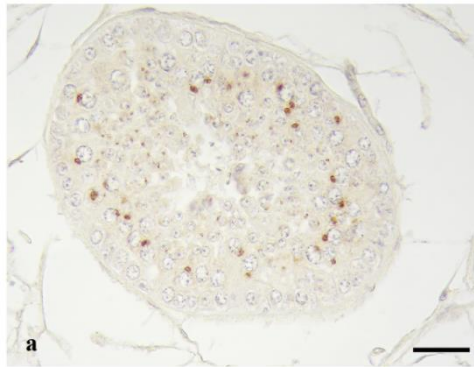


Tavola 15

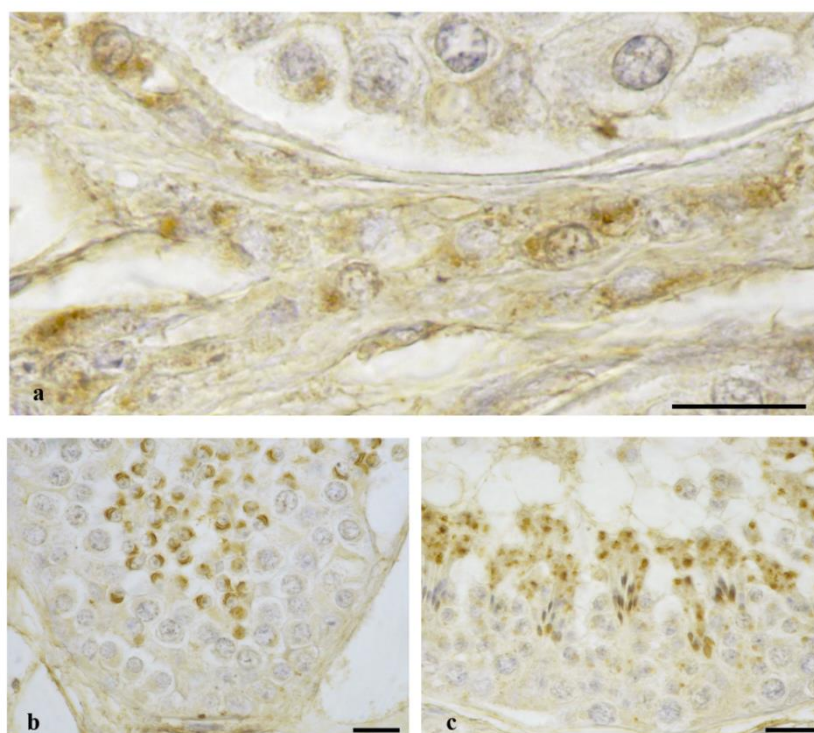


Tavola 16

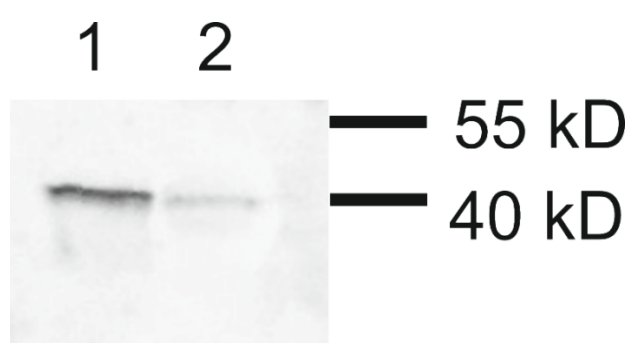


Tavola 17

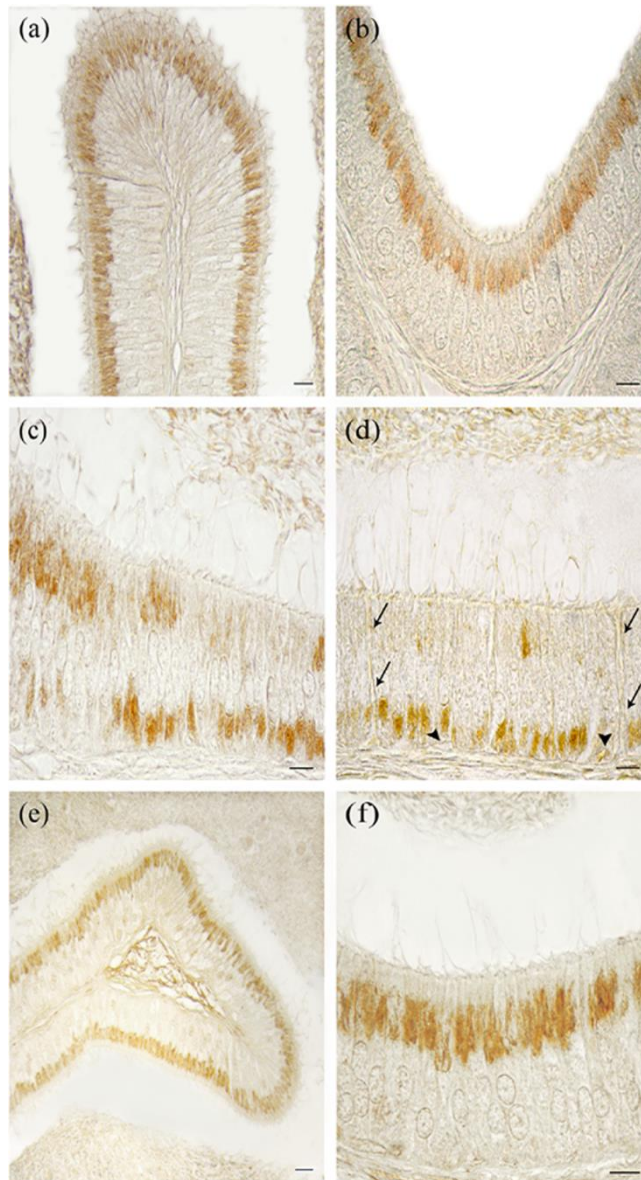


Tavola 18

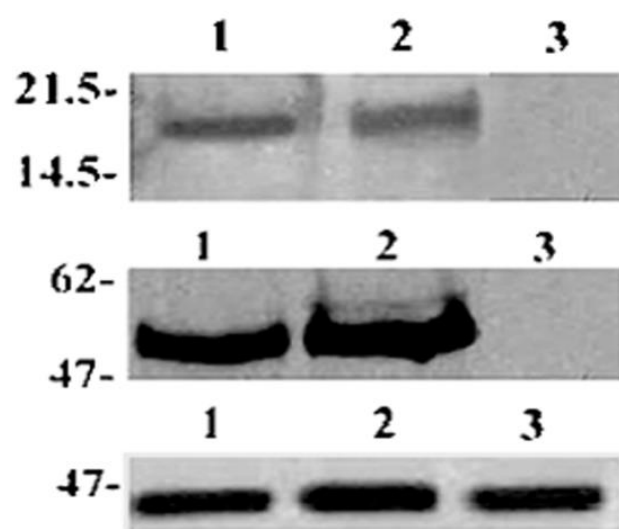


Tavola 19

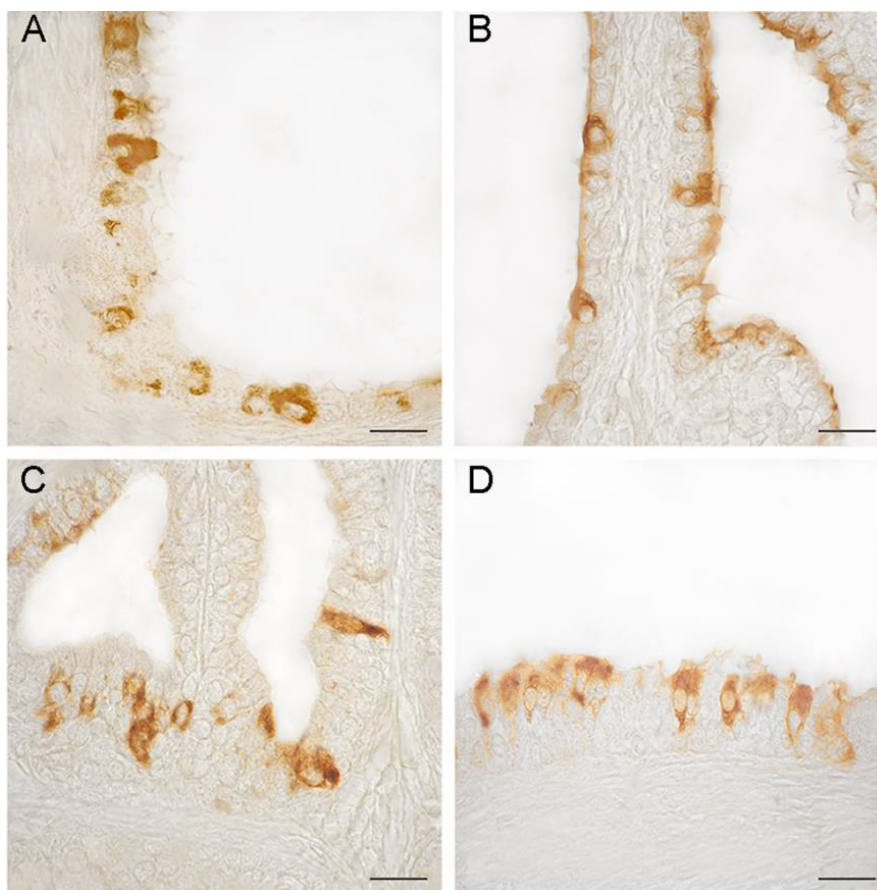


Tavola 20

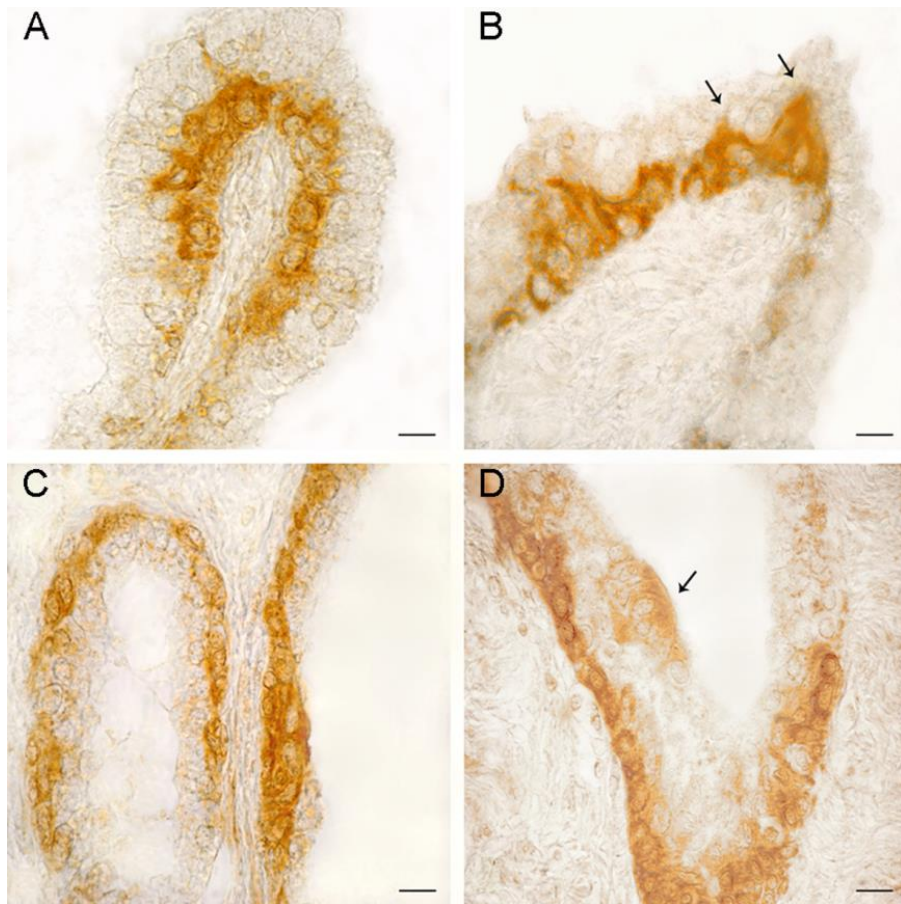


Tavola 21

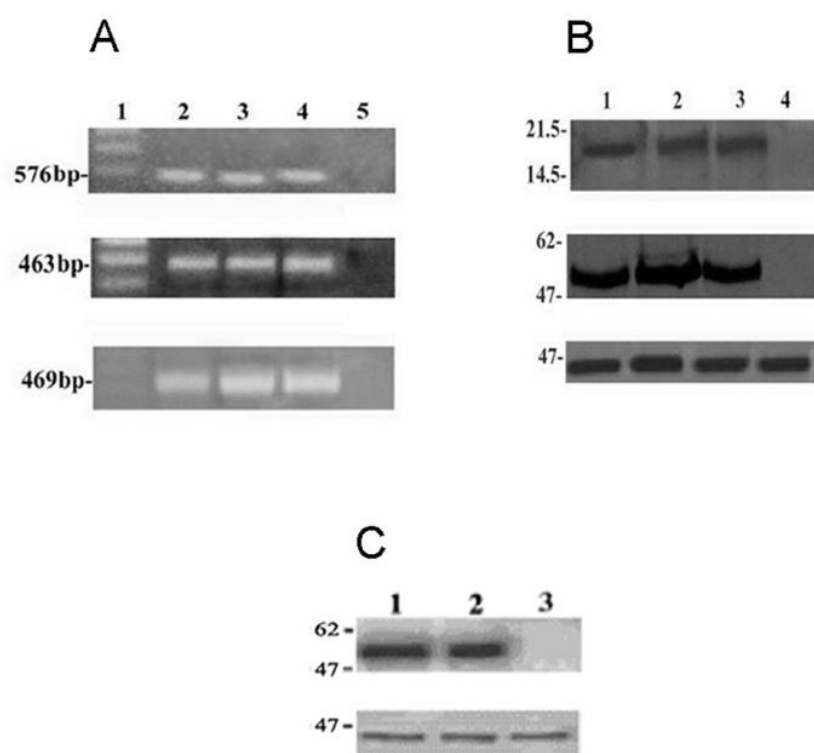


Tavola 22

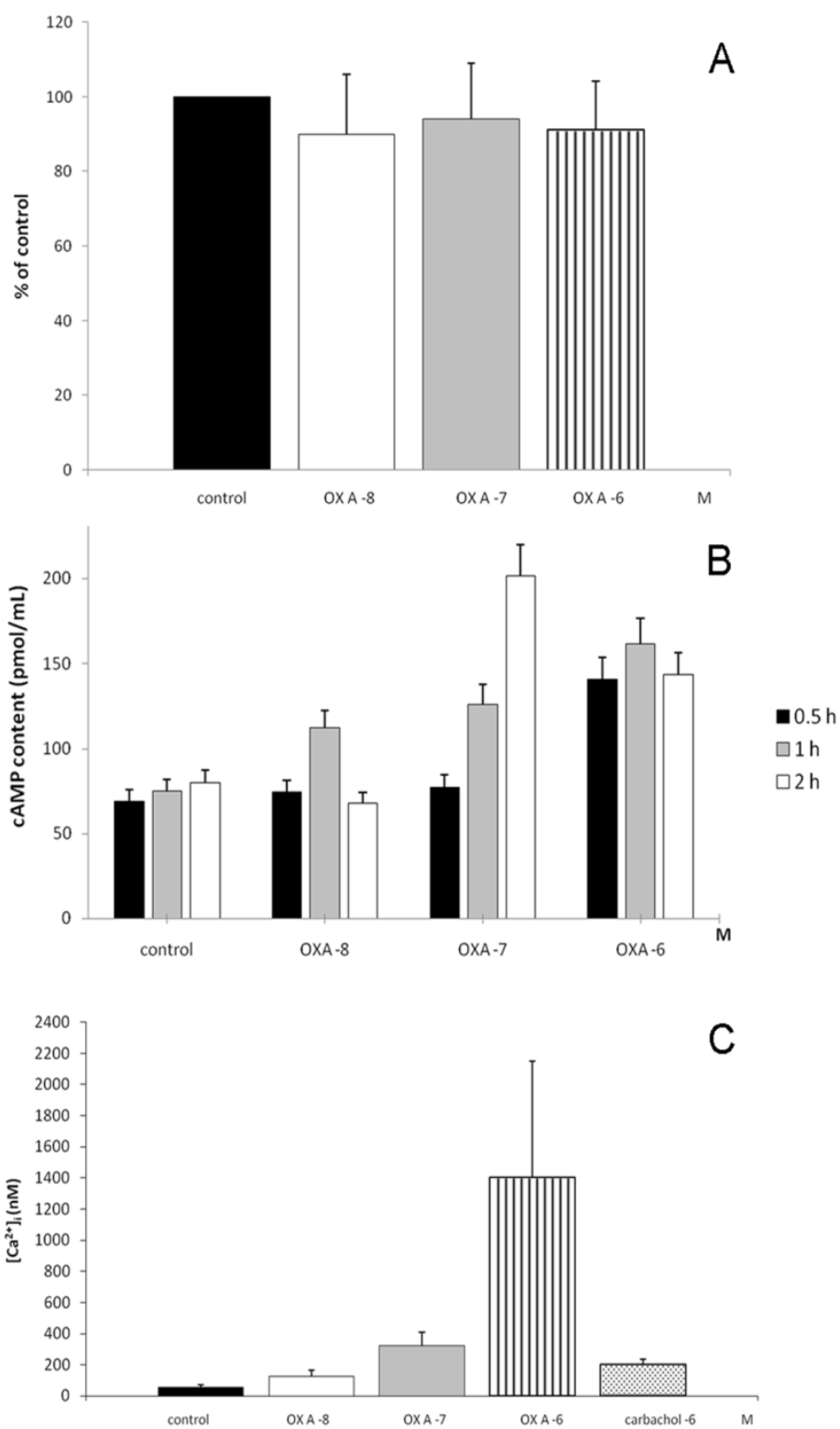


Tavola 23

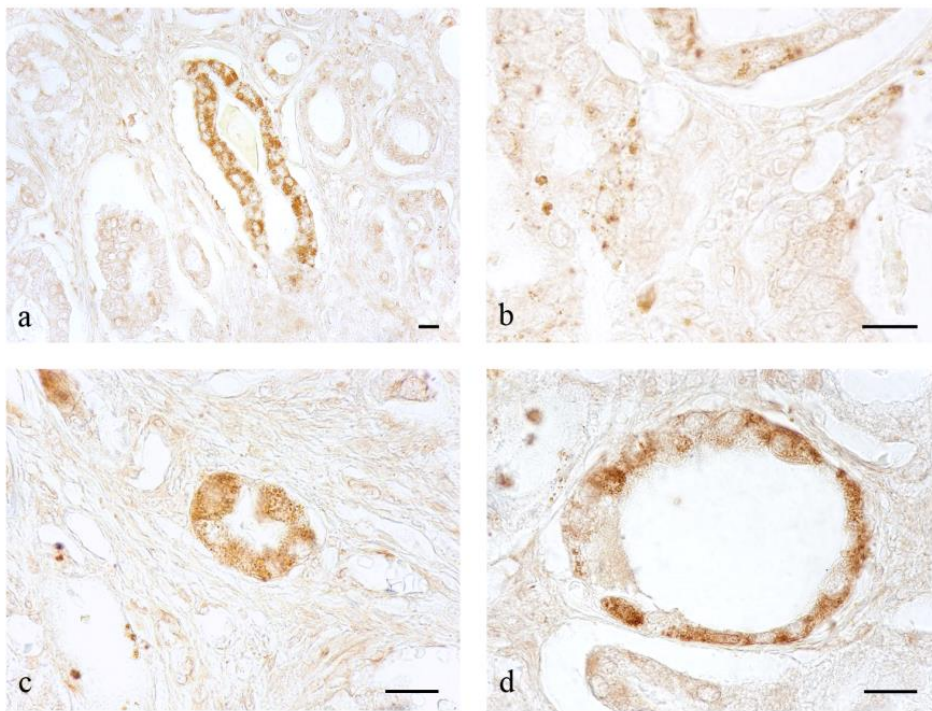


Tavola 24

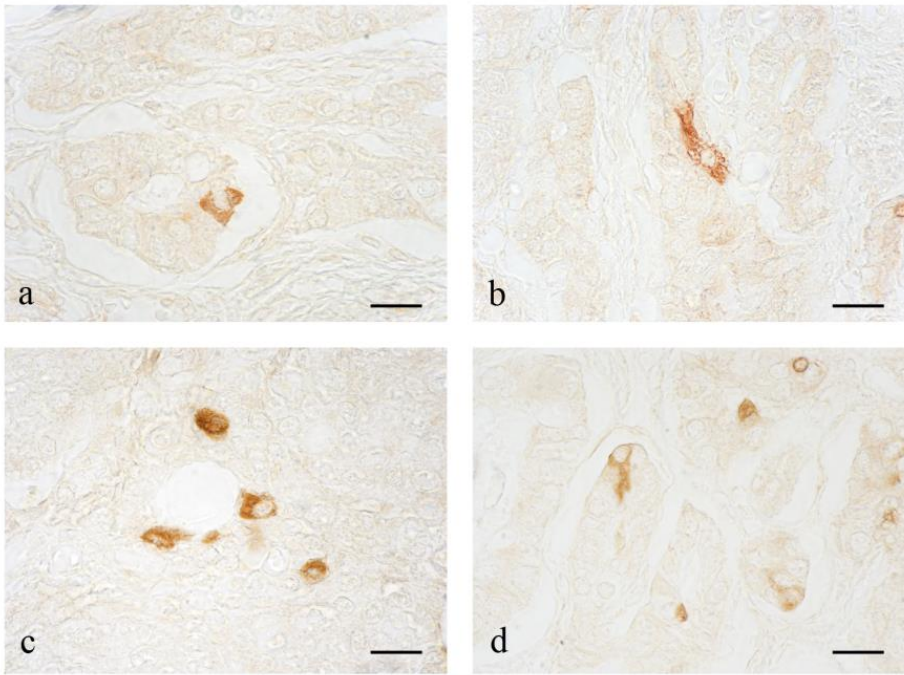


Tavola 25

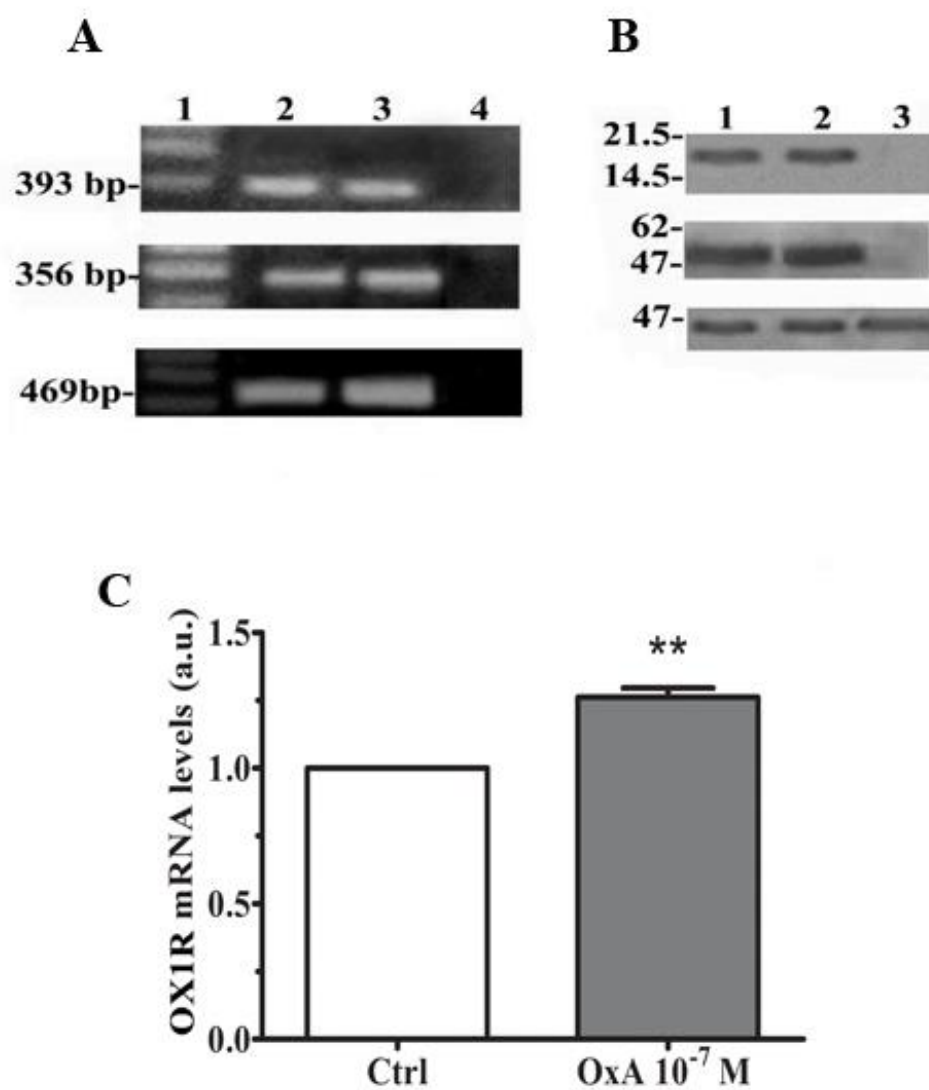


Tavola 26

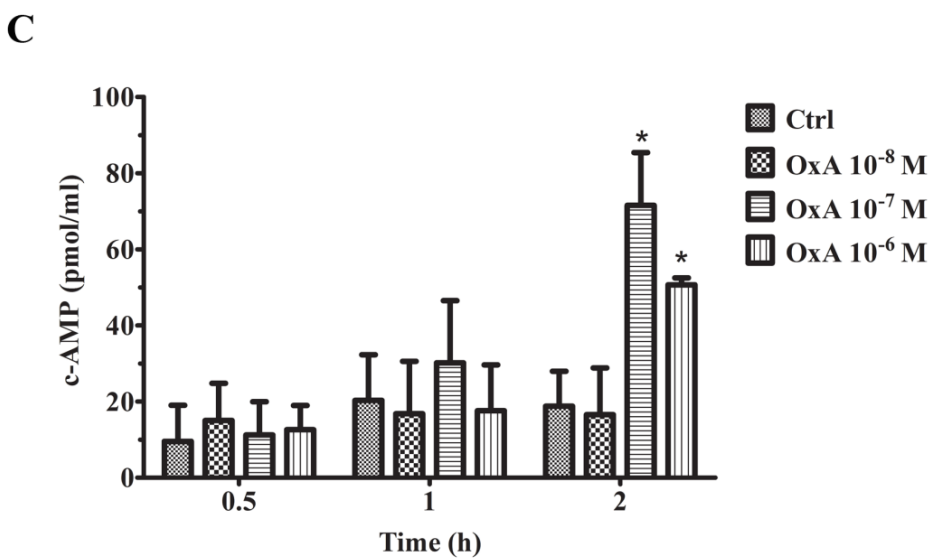
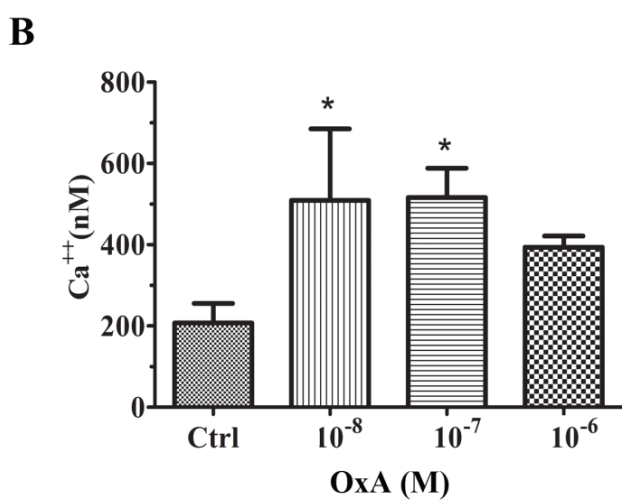
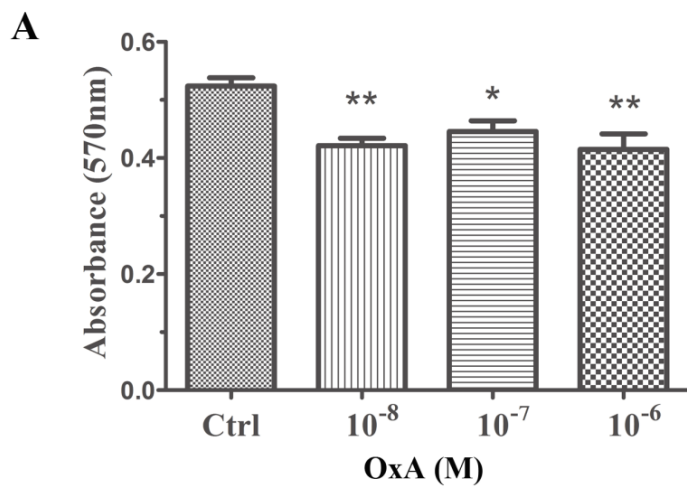


Tavola 27

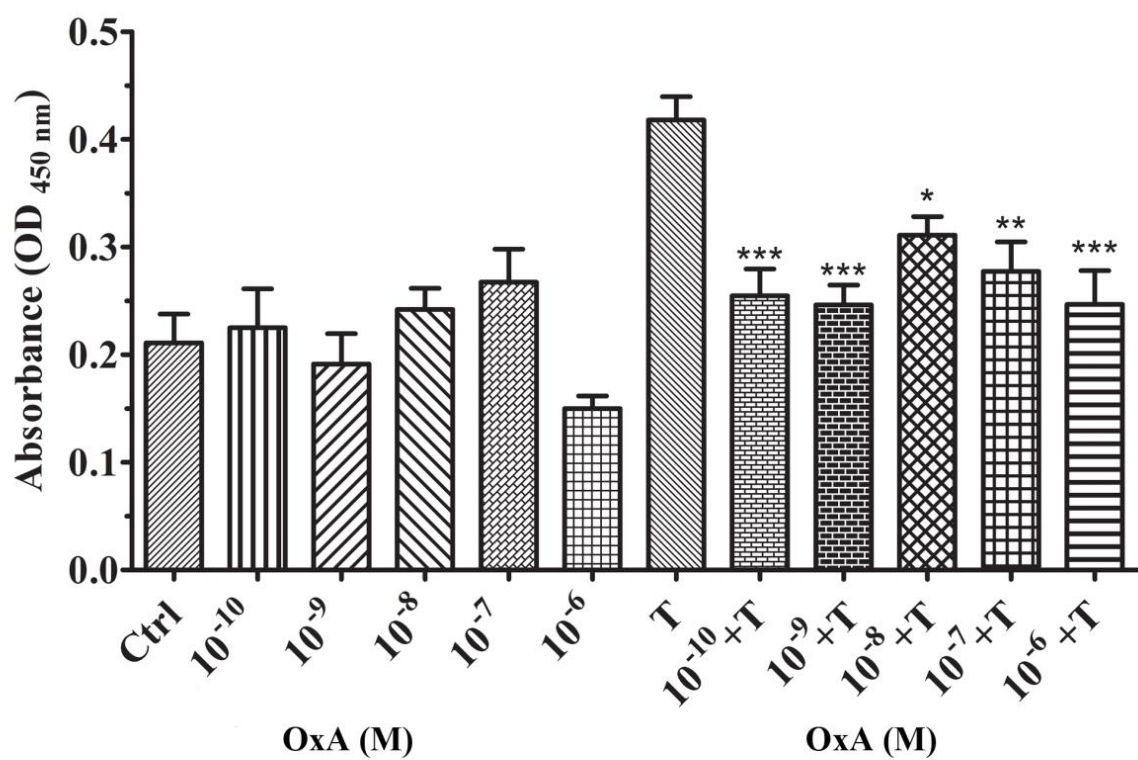


Tavola 28

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente lavoro vanno ad ampliare gli scarsi dati bibliografici relativi alla presenza ed alla funzione della prepro-orexina, dell'OxA, dell'OxB e dei relativi recettori 1 e 2 nell'apparato genitale di alcuni mammiferi e dell'uomo, prendendo in considerazione aspetti morfo-funzionali e patologici. Gran parte dei dati qui riportati vengono descritti per la prima volta nel testicolo del ratto e dell'alpaca, nell'epididimo dell'alpaca e nella prostata umana normale, iperplastica e carcinomatosa. In particolare i dati relativi alla presenza dell'OxB e dell'OX2R nel testicolo del ratto rappresentano la prima segnalazione immunoistochimica delle suddette sostanze in tale organo, sebbene siano necessari altri studi da effettuarsi presumibilmente su cellule germinali isolate allo scopo di valutare il ruolo specifico svolto dai componenti del complesso orexinergico nel testicolo di tale specie ed, in generale, dei mammiferi. L'immunoreattività all'OxB è stata qui descritta nel ratto negli spermatociti nello stadio di pachitene, e negli spermatidi durante le diverse fasi evolutive del loro sviluppo. In particolare, i citotipi positivi all'OxB sono stati evidenziati durante la seconda parte del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale, cioè dal VII al XIV stadio. Sempre nel testicolo di ratto l'OX2R è presente negli spermatociti in

pachitene e di seconda generazione e negli spermatidi nelle varie fasi evolutive. A differenza dell'OxB, i citotipi immunopositivi all'OX2R sono stati rinvenuti lungo l'intero ciclo evolutivo dell'epitelio germinale. Inoltre, immunoreattività all'OX1R è stata descritta negli spermatociti in zigotene e pachitene e negli spermatidi rotondi nel testicolo della stessa specie. Ancora, l'espressione dell'mRNA codificante per l'OX1R è stata riscontrata in frammenti di tubuli seminiferi di ratto coltivati in vitro in vari stadi di sviluppo dell'epitelio germinale (Barreiro et al., 2004). Sempre nel testicolo di ratto lo stesso gruppo di ricercatori (Barreiro et al., 2004) ha evidenziato la presenza dell'OxA negli spermatociti in fase di preleptotene, leptotene, zigotene e pachitene (Barreiro et al., 2005) così come nelle cellule del Sertoli e negli spermatidi nelle varie fasi maturative dal VII al XIV stadio del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale. La presenza dell'OX1R e dell'OX2R è stata investigata nel testicolo umano da Karteris e collaboratori (2004), i quali hanno evidenziato tale sostanza nelle cellule del Leydig e peritubulari e negli spermatogoni. Infine i componenti del complesso orexinergico sono stati evidenziati, come si commenterà oltre, in vari citotipi del testicolo di alpaca. Nel loro insieme, tali studi consentono di ipotizzare che il complesso orexinergico sia ampiamente diffuso nel testicolo dei mammiferi sia nel comparto interstiziale che in quello

tubulare svolgendo in entrambi i distretti funzioni ancora oggi quasi sconosciute.

Il peptide OxA è probabilmente prodotto sia nel comparto interstiziale che in quello tubulare ma la fonte più accreditata per la sua produzione sembra essere la cellula del Sertoli, come dimostrato nel corso di uno studio sperimentale (Barreiro et al., 2005) in cui fu indotta in ratti viventi necrosi selettiva delle cellule del Leydig. È stato ipotizzato che l'OxA possa inibire la secrezione dello “stem cell factor” (SCF) da parte della cellula del Sertoli (Barreiro et al., 2004). L'SCF è noto come agente stimolante la proliferazione del DNA degli spermatogoni per cui l'inibizione della sua sintesi suggerisce un'azione anti-proliferativa indiretta dell'OxA sulle cellule germinali. Tuttavia, non può essere esclusa un'azione diretta del peptide sull'epitelio germinale dovuta all'ampia diffusione dei suoi recettori nel compartimento tubulare del testicolo di ratto.

I risultati delle prove in vitro eseguite su sezioni di testicolo di ratto ed alpaca nel corso del presente lavoro e di altri precedenti (Barreiro et al., 2005) ci hanno consentito di dimostrare che l'OxA presenta una spiccata azione steroidogenica agendo in tempi che variano dai 90 minuti sino alle 12 ore. Circa il meccanismo d'azione con cui tale effetto viene ottenuto è utile qui premettere che Barreiro e collaboratori (2005) hanno evidenziato che l'OxA è in grado di inibire

la sintesi del MIS, noto fattore steroidolitico testicolare, da parte della cellula del Sertoli. Il presente studio conferma l'ipotesi dei suddetti autori in quanto evidenzia che l'OxA effettivamente antagonizza l'azione steroidolitica del MIS il quale, d'altro lato, riduce significativamente l'attività steroidogenica dell'OxA. E' possibile quindi ipotizzare che nel testicolo di ratto esista un "cross-talk" antagonista tra le due sostanze in questione che possa agire localmente quale via di regolazione principale o secondaria della steroidogenesi. Rimanendo in argomento va inoltre ricordato che Zheng e collaboratori (2014) hanno evidenziato che l'attivazione delle MAPK-p38 e dell'ERK 1/2 operata dall'OxA in cellule di Leydig di ratto coltivate in vitro determina attivazione della steroidogenesi basale. Tale azione viene espletata dall'OxA mediante l'attivazione del proprio recettore specifico OX1R. Analogamente stimolazione della steroidogenesi è stata descritta nelle cellule H295R derivate dalle ghiandole surrenali umane quando esse vengono incubate in vitro con entrambe le orexine ed il pathway responsabile di tale risposta coinvolge la fosfochinasi C (PKC) e l'ERK 1/2 (Wenzel et al., 2009; Ramanjaneya et al., 2009). Le proteine chinasi ERK 1 e 2 sono espresse in tutti i tessuti e partecipano alla cascata enzimatica dell'Ras-Raf-MEK-ERK che sembra regolare molteplici processi cellulari tra i quali l'adesione, la migrazione, la sopravvivenza, la

differenziazione, il metabolismo, la proliferazione e la trascrizione cellulare (Lu e Xu, 2006; Roskoski, 2012). L'attivazione dell'ERK 1/2 agisce inibendo l'apoptosi in risposta ad un'ampia gamma di stimoli, mentre l'inibizione dell'ERK 1/2 promuove l'apoptosi (Lu e Xu 2006).

Mentre l'OxA manifesta effetto prettamente steroidogenico nel testicolo di ratto le prove in vitro eseguite nel corso di questo lavoro sembrano dimostrare che l'OxB non sia coinvolto nel determinismo della steroidogenesi testicolare. D'altro lato il reperto che l'OxB determini inattivazione ERK 1/2, cioè de-fosforilazione dell'enzima sembra concordare con quanto sopra riportato circa la necessità dell'attivazione dell'enzima per l'induzione della steroidogenesi nel testicolo di ratto (Zheng et al., 2014). Sebbene siano necessari altri studi per meglio chiarire il meccanismo d'azione dell'OxB e dell'OX2R nel testicolo del ratto, i risultati qui riportati relativi alla de-fosforilazione dell'ERK 1/2 da parte dell'OxB, rappresentano la base di partenza per future ricerche sul potenziale ruolo di tale peptide nell'apparato genitale maschile.

Nel corso del presente lavoro è stata dimostrata l'espressione dell'mRNA codificante per l'OX2R e la presenza della relativa proteina nel testicolo di ratto. Tale reperto conferma quello descritto da Karteris e collaboratori (2004) che rinvennero l'espressione del

recettore 2 nel testicolo umano ma sono in contrasto con quelli di Barreiro e collaboratori (2005) e di Zheng e collaboratori (2014) che apertamente negano la presenza del recettore 2 nel testicolo di ratto. Analoghe discrepanze circa la presenza e l'espressione di vari componenti il complesso orexinergico sono stati registrate in altri organi periferici tra cui le ghiandole surrenali sufficientemente studiate in argomento in questi ultimi anni (Spinazzi et al., 2006). Sulla base della nostra esperienza tali discrepanze possono verificarsi non solo a causa di differenze tecniche e metodologiche utilizzate dai vari studiosi del complesso orexinergico ma anche a causa dell'elevato turnover della sintesi e/o internalizzazione di sostanze endocrine quali le orexine ed i relativi recettori.

L'altro tema di ricerca trattato nel presente lavoro di tesi ha riguardato lo studio della presenza delle orexine e dei relativi recettori 1 e 2 nel testicolo dell'alpaca. Immunoreattività all'OxA è stata riscontrata in molti citotipi del comparto intratubulare testicolare, dalle cellule del Sertoli agli spermatidi in varie fasi di maturazione. L'OxB è stato riscontrato negli spermatogoni ellittici, negli spermatociti in fase di preleptotene, zigotene e pachitene e negli spermatidi rotondi ed allungati. Immunoreattività all'OX1R ed all'OX2R è stata evidenziata nelle cellule del Leydig e negli spermatidi. L'espressione della prepro-orexina, dell'OX1R e dell'OX2R è stata valutata mediante la

tecnica del western blotting che ha confermato i dati immunoistochimici. Come nel ratto anche in tale specie, le prove in vitro hanno dimostrato un effetto steroidogenico indotto dall'OxA ed un'azione antagonista tra tale peptide ed il MIS. L'analogia dei dati sperimentali esistente tra il testicolo di ratto ed alpaca circa la presenza in essi di strutture orexinergiche consente di estendere i punti di discussione relativi al testicolo della prima specie anche a quello della seconda.

Nell'epididimo dell'alpaca immunoreattività all'OxA ed all'OX1R è stata riscontrata nel citoplasma delle cellule principali della testa dell'organo. La tecnica del western blotting ha consentito di confermare i dati immunoistochimici. Altre sostanze endocrine simili all'orexina sono state riscontrate nelle cellule principali dell'epididimo di ratto. Esse sono: calcitonin gene-related peptid (CGRP) (Leung et al., 1992; Brian e Cox, 2006), secretina (Chow et al., 2004) e pituitary adenilate cyclase activating polypeptide (PACAP) (Zhou et al., 1997; Leung et al., 1998). Tutte presentano analogie con le caratteristiche dell'OxA e dell'OX1R. I recettori dei suddetti peptidi, infatti, sono costituiti da sette domini trans-membrana associati a proteina G all'interno del citoplasma e la loro localizzazione è sopranucleare e più raramente infranucleare. Il ruolo funzionale della secretina epididimale è rappresentato dell'apertura

del canale ionico CFTR-Cl⁻ localizzato lungo la membrana delle cellule principali. Attraverso tali canali, gli ioni cloro e bicarbonato sono trasferiti dal citoplasma al lume dell'organo in cui regolano la quantità di acqua presente (Chow et al., 2004). Con tale meccanismo le cellule principali regolano la fluidità del compartimento luminale che risulta di fondamentale importanza per il mantenimento della fertilità e della motilità degli spermatozoi (Cornwall, 2009). I peptidi CGRP (Leung et al., 1992; Brian e Cox, 2006) e PACAP (Zhou et al., 1997; Leung et al., 1998) agiscono secondo le medesime modalità d'azione della secretina, con l'unica eccezione che il trasferimento ionico è limitato al cloro ed al bicarbonato, rispettivamente. E' dunque probabile che il ruolo dell'OxA epididimale sia simile a quello descritto per le altre sostanze endocrine, viste le analogie esistenti tra esse e l'OxA.

Nella prostata umana normale, iperplastica e neoplastica, l'OxA e l'OX1R sono stati rinvenuti nel citoplasma delle cellule epiteliali follicolari esocrine. L'espressione degli mRNA codificanti per la prepro-orexina e l'OX1R nonché la presenza delle relative proteine negli estratti tissutali sono state dimostrate mediante le tecniche dell'RT-PCR e del western blotting, rispettivamente. Allo scopo di conseguire nuove conoscenze relative al ruolo funzionale dell'OxA nella prostata normale, la linea cellulare PNT1A, esprimente OX1R, è

stata trattata con differenti concentrazioni di OxA allo scopo di valutare la proliferazione cellulare e le eventuali variazioni di cAMP e di Ca^{++} intracitoplasmatico. La proliferazione della linea cellulare non risulta variata ma sono stati registrati incrementi di cAMP e del rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico.

Studi precedenti eseguiti sulla prostata umana non hanno segnalato la presenza dell'OxA e dell'OX1R (Nakabayashi et al., 2003; Malendowicz et al., 2011). Tale discrepanza tra i suddetti dati e quelli qui rilevati richiama quanto già descritto per il testicolo e la relativa discussione del problema può senz'altro essere estesa ai reperti riguardanti la prostata. Ai rilievi già fatti in precedenza può aggiungersi la constatazione che la distribuzione dell'OxA e dell'OX1R nella prostata umana ed in quella di bovino normali (Russo et al., 2008) è limitata a piccole aree dell'organo alternate ad ampie zone negative, per cui il prelievo casuale di frammenti di tessuto può dar vita a risultati contrastanti.

I risultati ottenuti nel presente lavoro descrivono che l'OxA non influenza la proliferazione della linea cellulare normale PNT1A ma stimola la sintesi del cAMP. Dati contrastanti sono stati riportati circa l'azione svolta dalle orexine sulla proliferazione di linee cellulari normali. Entrambe le orexine manifestano un effetto anti-proliferativo sugli osteoblasti del cranio (Ziolkowska et al., 2008). Mentre l'OxA

stimola la crescita dei pre-adipociti 3T3 L1, l'OxB mostra un effetto inibente sulla stessa linea cellulare (Zwirska-Korczala et al., 2007). L'OxB riduce la proliferazione dei neuroni dell'ippocampo (Ito et al., 2008). L'OxA stimola la proliferazione delle cellule adrenocorticali in seguito al legame con l'OX1R ed un effetto anti-proliferativo se lega l'OX2R (Spinazzi et al., 2005a). Al contrario i dati qui riportati per l'attivazione dell'cAMP nella prostata normale da parte dell'OxA collimano con quelli bibliografici in argomento. L'OxA stimola la cascata enzimatica dell'adenilato ciclasti/fosfochinasi A nelle cellule adrenocorticali di uomo e ratto mediante il legame con l'OX1R (Spinazzi et al., 2005b) e dell'adenilato ciclasti in cellule CHO (Holmqvist et al., 2005). Sempre nel presente lavoro, è stato dimostrato che l'OxA stimola fortemente il rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico nelle PNT1A. Tali dati confermano studi precedenti che dimostrano che l'OxA determina rilascio di Ca^{++} intracitoplasmatico in cellule surrenali e CHO attraverso l'attivazione della PLC e la produzione di IP3 (Smart et al., 1999; Kane et al., 2000; Lund et al., 2000; Holmqvist et al., 2001; Ammoun et al., 2003; Larsson et al., 2005).

Una sovrastimolazione della sintesi di OX2R ed una riduzione dei livelli ematici di OxA in pazienti affetti da iperplasia prostatica hanno consentito di ipotizzare un ruolo dell'OX2R nella patogenesi di tale

malattia (Malendowicz et al., 2011). I dati immunoistochimici qui rilevati nella prostata normale ed iperplastica mostrano una prevalente localizzazione dell'OxA e dell'OX1R nella porzione basale dell'epitelio follicolare. Le cellule basali prostatiche sono coinvolte nel rinnovo dell'epitelio luminale (El-Alfy et al., 2000) e nelle fasi proliferative dei processi carcinomatosi (Goldstein et al. 2010; Lawson et al., 2010). Quindi l'ipotesi che l'OxA sia coinvolta nei normali processi prostatici proliferativi sia normali che patologici appare plausibile.

Come detto in precedenza la linea cellulare prostatica LNCaP di derivazione neoplastica è stata scelta per lo studio in vitro degli effetti dell'OxA sul carcinoma prostatico.

Si premette che una recente ricerca condotta su linee cellulari ottenute da carcinoma del colon umano (HT29-D4, caco-2, SW480 e LoVo) (Rouet-Benzineb et al., 2004) ha dimostrato che le suddette cellule esprimevano il recettore OX1R e che l'aggiunta di OxA alle colture induceva drastica apoptosi. Lo stesso fenomeno apoptotico veniva indotto dall'OxA nelle seguenti linee cellulari, neoplastiche e non, anche esse esprimenti il recettore OX1R: CHO derivate da ovaio di Hamster (Laburthe e Voisin, 2012), AR42J da neoplasia del pancreas di ratto (Harris et al., 2002), SK-N-MC da neuroblastoma umano (Rouet-Benzineb et al., 2004), C6 da glioma di ratto (Biegańska et al.,

2012), DU145 da prostata umana carcinomatosa (Alexandre et al., 2014). Inoltre il trattamento con OxA di topi portatori di neoplasia sottocutanea indotta da xenotrapianto di cellule ottenute da cancro del colon umano (LoVo) provoca drastica diminuzione della massa neoplastica (Voisin et al., 2011). L'insieme di tali dati ha autorizzato l'ipotesi che il trattamento con OxA di varie forme carcinomatose esprimenti il recettore OX1R possa indurre apoptosi della massa neoplastica e conseguente sua diminuzione. Alcuni autori hanno quindi prospettato la possibilità che il complesso orexinergico possa avere utile impiego nella terapia di varie forme di cancro (Voisin et al. 2011).

Allo scopo di valutare il meccanismo d'azione dell'OxA in cellule prostatiche di derivazione neoplastica è stata preliminarmente eseguita una real time PCR sulla linea cellulare LNCaP che ha dimostrato di possedere il gene codificante per l'OX1R e che il trattamento con OxA determina incremento della sua espressione. Tali dati confermano quanto descritto in studi precedenti secondo i quali il trattamento con OxA stimola l'espressione del gene codificante l'OX1R il cellule luteali e follicolari ovariche (Cataldi et al., 2012), in una linea cellulare ottenuta da osteoblasti cranici (ROB) (Ziolkowska et al., 2008), in cellule insulino-secernenti (INS-1) (Chen et al., 2013) ed in epatociti (Ju et al., 2014). Tali dati risultano però in contrasto

con quanto recentemente descritto nella stessa linea cellulare (LNCaP) risultata sfornita del recettore OX1R (Alexandre et al., 2014).

Gli esperimenti in vitro qui condotti sulle cellule LNCaP hanno evidenziato che l'aggiunta di OxA alla coltura determina, a tutte le concentrazioni usate, una riduzione della proliferazione cellulare. Tale dato, che d'altronde rimane preliminare conferma quanto riscontrato da altri circa l'apoptosi indotta da OxA e sopra riportati.

Altro dato messo in evidenza nel presente lavoro è la stimolazione della sintesi di cAMP e l'aumento del Ca^{++} intracitoplasmatico osservati nelle LNCaP dopo stimolazione con OxA. Il primo dato, relativo all'aumento di cAMP, può essere considerato una conferma che la presenza del ligando OxA stimola il recettore OX1R in quanto è ormai accertato che l'interazione OxA/OX1R attiva il pathway dell'adenilato ciclastasi (Spinazzi et al., 2006).

La prostata è un organo androgeno-dipendente in grado di sintetizzare gli AR, la cui attività è regolata non solo dalla presenza degli androgeni ma anche da co-attivatori che ne facilitano la trascrizione (Agoulnik et al., 2006). E' ormai noto che il legame tra gli androgeni e gli AR assume un ruolo cardine nella progressione del cancro prostatico mediante meccanismi genetici ed epigenetici (Yuan et al., 2014). L'approccio terapeutico in corso di cancro prostatico umano

prevede soprattutto l'utilizzo di inibitori della sintesi degli AR e del loro ligando (Nouri et al., 2014). Una forma di cancro prostatico resistente alla suddetta terapia, definito castration resistant prostatic cancer (CRPC), recidiva in tempi brevissimi ed ha exitus nefasto (Grossman et al., 2013; Yuan et al., 2014). Nel CRPC, nonostante i livelli ematici di androgeni siano praticamente irrilevabili, l'azione degli AR persiste a causa della probabile sintesi di T o di suoi precursori da parte delle ghiandole surrenali (Sharifi e Auchus, 2012). Inoltre la presenza e l'attività degli AR sembra stimolata dai seguenti fattori: 1. amplificazione del gene codificante per gli AR ed incremento della relativa espressione; 2. mutazione degli AR che conferisce maggiore specificità del ligando; 3. variazione del rapporto tra AR e relativi co-attivatori; 4. incremento dell'espressione degli enzimi steroidogenici; 5. iper-stimolazione del segnale di trasduzione associato all'attivazione degli AR indipendentemente dal ligando (Shafi et al., 2013; Yuan et al., 2014).

Nel presente lavoro è stato indagato l'effetto dell'OxA sulla traslocazione nucleare degli AR nelle cellule LNCaP. I risultati descritti hanno consentito di dimostrare che il trattamento con OxA inibisce l'uptake intranucleare degli AR in presenza di T. Tale risultato appare di notevole interesse sebbene ulteriori studi, ora in

corso, siano necessari per chiarire il meccanismo d'azione del complesso orexinergico nella cellula prostatica neoplastica.

In conclusione, questo lavoro di tesi apporta un contributo alla migliore conoscenza della diffusione del complesso orexinergico nell'apparato genitale di mammiferi. Inoltre esso costituisce una base di partenza per ulteriori studi funzionali tendenti a chiarire il ruolo svolto dal suddetto complesso nell'apparato genitale ed il possibile impiego dell'OxA nella terapia del cancro prostatico.

6. LEGENDA TAVOLE

Tavola 1. Analisi immunoistochimica per la valutazione della presenza dell'OX1R nel testicolo di ratto con riferimento alle fasi progressive del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale. **a,b** Nel citoplasma degli spermatociti in fase di zigotene sono chiaramente visibili piccoli gruppi di granuli positivi. **c,d** Gli spermatociti in pachitene (*frecce*) presentano materiale debolmente positivo nel citoplasma. **e,f** Spermatidi rotondi presentano positività di aspetto semilunare a livello acrosomiale e caratterizzano il passaggio dalla VII alla XIV fase del ciclo. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 μ m.

Tavola 2. Espressione dell'mRNA codificante per l'OX1R e della relativa proteina nel testicolo del ratto. **a RT-PCR.** mRNA codificante per l'OX1R nel cervello di ratto, utilizzato come controllo positivo (canale 2) e nel testicolo della medesima specie (canale 3). Il canale 1 corrisponde ai markers di DNA a peso molecolare noti ed il canale 4 al controllo negativo (acqua distillata). Nel pannello **a** in basso è mostrata l'espressione del trascritto per la β -actina, usata come controllo interno. **b Western Blotting.** Il canale 1 corrisponde all'omogenato di cervello di ratto, il canale 2 all'omogenato di

testicolo di ratto, il canale 3 al controllo negativo (omogenato di testicolo trattato con l'anticorpo diretto contro l'OX1R e pre-incubato con il suo peptide di controllo). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali, il blot superiore è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannello inferiore). I markers indicanti il peso molecolare sono collocati sulla sinistra.

Tavola 3. Effetti dell'OxA e del MIS sulla steroidogenesi. Sezioni sottili di testicolo di ratto sono state coltivate in vitro e trattate con l'OxA ed il MIS per 12 ore. In alcuni esperimenti, le sezioni trattate con l'OxA o con il MIS per 6 ore sono state incubate con il MIS o l'OxA, rispettivamente, per un intervallo di tempo totale 12 ore. In un'altra serie di esperimenti, le sezioni precedentemente trattate con l'OxA sono state incubate con l'inibitore dell'OX1R SB408124. Sono stati utilizzati come controllo (CTR) tessuti incubati solo con il medium. L'ormone LH è stato utilizzato come controllo positivo degli esperimenti ad una concentrazione di 500 ng/mg di tessuto. I dati riportati rappresentano la media statistica di 3 differenti determinazioni effettuate in duplicato. * $P < 0.05$ rispetto al controllo; ** $P < 0.01$ rispetto al controllo.

Tavola 4. Valutazione immunoistochimica dell'OxB nel testicolo di ratto con riferimento alle varie fasi del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale. **a** un piccolo gruppo di materiale reattivo (*freccie*) è contenuto nel citoplasma di alcuni spermatociti in pachitene. **b-d** materiale immunoreattivo contenuto nel citoplasma degli spermatidi rotondi (**b**), ovali (**c**) ed allungati (**d**) la cui stadio di progressione è evidenziato dall'allungamento dei loro nuclei. I granuli positivi negli spermatidi ovali (**c**) ed allungati (**d**) sono collocati nella porzione intermedia/terminale del citoplasma. Le *teste di freccia* indicano 3 cellule tagliate in senso longitudinale mostranti la corrispondenza tra granuli positivi e nuclei degli spermatidi allungati. **e** citotipi immunoreattivi all'OxB sono stati riscontrati nella seconda metà del ciclo germinale (dal VII al XIV stadio). Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 µm.

Tavola 5. Controllo di specificità degli anticorpi anti-OxA ed anti-OxB utilizzati. **a-d** due coppie di sezioni (**a,b** e **c,d**) di 3 µm spessore sono state colorate alternativamente con gli anticorpi anti-OxB (**a,c**) ed anti-OxA (**b,d**). Materiale immunoreattivo all'OxB è presente negli spermatidi rotondi (**a**) ed allungati (**c**), mentre non risulta alcuna traccia di positività nelle sezioni consecutive (**b,d**). **e** Le cellule del

Leydig reattive all'OxA sono state scelte come controllo positivo. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 μ m.

Tavola 6. Valutazione immunoistochimica dell'OX2R nel testicolo di ratto con riferimento alle fasi progressive del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale. a,b Negli spermatociti in pachitene (**a**) e negli spermatociti secondari (**b**), il materiale immunoreattivo appare come un singolo granulo rotondeggiante in prossimità del nucleo, come evidenziato nella figura (**a**). **c-e** durante il ciclo evolutivo degli spermatidi, il materiale positivo cambia progressivamente aspetto e localizzazione, in particolare, in quelli rotondi (**c**), presenta aspetto semilunare, mentre in quelli ovali (**d**) ed allungati (**e**), si trasforma in un unico granulo contenuto nella porzione media e caudale del citoplasma. Le *frecce* (**d,e**) indicano cellule tagliate in senso longitudinali mostranti una netta corrispondenza tra nucleo e positività. **f** citotipi immunoreattivi all'OX2R sono stati riscontrati lungo tutto il ciclo germinale. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 25 μ m.

Tavola 7. Espressione dell'mRNA codificante per l'OX2R e della relativa proteina nell'omogenato del testicolo di ratto. A RT-PCR.

Canale 1, markers di DNA a peso molecolare noti. Canale 2, mRNA codificante per l'OX2R nel testicolo di ratto. Canale 3, controllo negativo. Nel pannello in basso è mostrata l'espressione del trascritto per la β -actina, usata come controllo interno. **B Western Blotting.**

Canale 1, omogenato di testicolo di ratto. Canale 2, omogenato di testicolo di ratto trattato con l'anticorpo diretto contro l'OX2R e pre-incubato con il suo peptide di controllo. Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa, il blot è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannello inferiore). I markers indicanti il peso molecolare sono collocati sulla sinistra. **C Effetti dell'OxB sulla steroidogenesi.**

Sezioni tissutali di testicolo di ratto sono state coltivate in vitro e trattate con concentrazioni progressive (10^{-9} a 10^{-6} M) di OxB o 1nM di OxA per 12 ore. Sono stati utilizzati come controllo (CTR) tessuti incubati esclusivamente con il medium. L'ormone LH è stato utilizzato come controllo positivo degli esperimenti ad una concentrazione di 500 ng/mg di tessuto. I dati riportati rappresentano la media statistica di 3 differenti determinazioni effettuate in duplicato. * $P < 0.05$ rispetto al controllo; ** $P < 0.01$ rispetto al controllo. **D Effetti dell'OxB sulla fosforilazione dell'ERK 1/2.** Sezioni sottili di testicolo sono state

adsorbite con 1 nM di OxB sia in presenza che in assenza dell'antagonista del recettore 2 TCS OX2 29 ed incubate per 12 ore. Le sezioni tissutali di controllo sono state incubate esclusivamente con il medium. Successivamente, le sezioni tissutali sono state omogeneizzate e sottoposte alle tecniche dell'elettroforesi SDS-PAGE e del western blotting, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-fosfo-ERK 1/2. Canali 1-3, controlli non trattati. Canali 4-6, sezioni trattate con l'OxB. Canali 7-9, sezioni trattate contemporaneamente con l'OxB e con l'inibitore dell'OX2R TCSOX2 29 (100 nM). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa, il blot superiore è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannello inferiore).

Tavola 8. Valutazione immunoistochimica dell'OxA nel testicolo dell'alpaca. **a** cellule del Leydig il cui citoplasma è completamente cosparso di materiale granulare positivo. **b** granuli di secrezioni debolmente positivi nella porzione basale del citoplasma di tre cellule del Sertoli (*frecce*). **c,d** spermatogoni ovali/ellittici (*frecce*) (**c**) e spermatociti in pre-leptotene (*frecce*) (**d**) sono allineati lungo la membrana basale. **e,f** spermatidi rotondi (**e**) ed ovali (**f**) contengono materiale immunoreattivo che presenta localizzazione perinucleare nei

rotondi e periferica negli ovali. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 20 μ m.

Tavola 9. Valutazione immunoistochimica dell'OX1R nel testicolo dell'alpaca. a,b un gruppo di cellule del Leydig che presentano diversa intensità di colorazione del citoplasma. **c-e** i corpi acrosomiali degli spermatidi rotondi (c), ovali (d) ed allungati (e) contengono materiale reattivo che progressivamente varia di aspetto e localizzazione nel corso del ciclo evolutivo. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 20 μ m.

Tavola 10. Presenza della prepro-orexine dell'OX1R mediante la tecnica del western blotting nel testicolo di alpaca. Canale 1: omogenato di cervello di ratto. Canale 2: omogenato di testicolo di alpaca. I markers indicanti il peso molecolare sono espressi in kDa.

Tavola 11. Azione steroidogenica dell'OxA in vitro nel testicolo di alpaca. Sezioni di testicolo di alpaca sono state trattate con l'OxA e con l'antagonista dell'OX1R SB408124, separatamente o contemporaneamente. I livelli di T sono stati monitorati per 90 e 180 minuti. I valori ottenuti sono stati normalizzati per g di tessuto incubato. I dati sono stati espressi come media \pm SEM (9

campioni/gruppo). * $p < 0.01$ rispetto al controllo; ** $p < 0.01$ rispetto all'OxA da sola (metodo ANOVA seguito dallo Student test).

Tavola 12. Effetti dell'OxA e del MIS sulla steroidogenesi testicolare dell'alpaca. Sezioni di testicolo di alpaca sono state incubate con l'OxA o con il MIS, e ed i livelli di T nella media sono stati monitorati dopo 6 ore. Dopo questo lasso di tempo alcune sezioni sono state incubate con MIS od OxA, rispettivamente ed il tempo di incubazione è stato prolungato fino a 12 ore. I valori ottenuti sono stati normalizzati per g di tessuto incubato. I dati sono stati espressi come media \pm SEM (9 campioni/gruppo). * $p < 0.05$ rispetto al controllo; ** $p < 0.01$ rispetto al controllo; Δ $p < 0.01$ rispetto all'OxA da sola; $^{\circ}$ $p < 0.01$ rispetto al MIS da solo (metodo ANOVA seguito dallo Student test).

Tavola 13. Saggio di valutazione della vitalità tissutale. Sezioni di testicolo di alpaca sono state incubate con o senza l'ormone LH (500 ng/g di tessuto) ed i livelli di T sono stati monitorati dopo 90, 180, 360 e 720 minuti. I valori ottenuti sono stati normalizzati per g di tessuto incubato. I dati sono stati espressi come media \pm SEM (9 campioni/gruppo). * $p < 0.01$ rispetto al corrispondente controllo. (metodo ANOVA seguito dallo Student test).

Tavola 14. Immunoreattività all'OxB nel testicolo dell'alpaca. a,b

alcuni spermatogoni ovali/ellittici (a) e spermatociti in fasi di pre-leptotene (b) localizzati lungo la membrana basale presentano materiale granulare reattivo nel citoplasma. c,d alcuni granuli positivi sono localizzati nel citoplasma di spermatociti in zigotene (c) e pachitene (d). e,f spermatidi rotondi (e) ed allungati (f) presentano materiale reattivo a localizzazione perinucleare nei primi e nella porzione caudale del citoplasma nei secondi (*frecce*). Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 µm.

Tavola 15. Controllo di specificità degli anticorpi anti-OxA ed

anit-OxB utilizzati nel testicolo dell'alpaca. a-d due coppie di sezioni consecutive di 3 µm di spessore sono state colorate alternativamente con l'anticorpo anti-OxB (a,c) e con l'anticorpo anti-OxA (b,d). E' stata evidenziata immunoreattività all'OxB e non all'OxA. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 µm.

Tavola 16. Immunoreattività all'OX2R nel testicolo dell'alpaca. a

piccoli gruppi di cellule del Leydig presentano differente intensità di

colorazione. **b,c** spermatidi rotondi (**b**) ed allungati (**c**) contengono materiale reattivo in posizione perinucleare nei primi che gradatamente si allontana dal nucleo disponendosi nella sua porzione terminale nei secondi. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 μ m.

Tavola 17. Presenza dell'OX2R mediante tecnica del Western Blotting. Canale 1: omogenato di testicolo di alpaca. Canale 2: omogenato di cervello di ratto. I markers indicanti il peso molecolare sono espressi in kDa.

Tavola 18. Valutazione immunoistochimica dell'OxA (a-d) e dell'OX1R (e,f) nell'epididimo dell'alpaca. **a** cellule principali positive all'OxA lungo la porzione intraluminale della parete tubulare. **b,c** materiale immunoreattivo all'OxA in posizione sopranucleare (**b**) ed infranucleare (**c**) del citoplasma delle cellule principali. **d** cellule AMR (*frecce*) e basali (*teste di freccia*) collocate tra le cellule principali positive. **e** cellule principali positive all'OX1R lungo la porzione intraluminale della parete tubulare. **f** materiale positivo all'OX1R in posizione sopranucleare del citoplasma delle cellule principali. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 10 μ m.

Tavola 19. Presenza della prepro-orexina (blot superiore) e dell'OX1R (blot inferiore) mediante tecnica del Western Blotting.

Canale 1: omogenato di cervello di ratto (controllo positivo). Canale 2: omogenato di epididimo di alpaca. Canale 3: omogenato di epididimo trattato con la prepro-orexina ed OX1R e pre-adsorbito con i rispettivi peptidi bloccanti (controllo negativo). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali, il blot è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannello inferiore). I markers indicanti il peso molecolare sono espressi in kDa.

Tavola 20. Analisi immunoistochimica dell'OxA (A,B) e dell'OX1R (C,D) nella prostata umana normale. **A** cellule sparse nell'epitelio follicolare prostatico. **B** la maggior parte delle cellule positive contengono materiale granulare positivo all'OxA nella porzione apicale del citoplasma. **C,D** cellule positive nell'epitelio di tre follicoli prostatici. Alcuni di essi sono allungati e sono costituiti da gruppi di granuli immunoreattivi. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 20 µm.

Tavola 21. Analisi immunoistochimica dell'OxA (A,B) e dell'OX1R (C,D) nella prostata umana iperplastica. **A** la membrana

basale di una struttura infrafollicolare, simil papillare è costituita da una linea continua di cellule completamente positive. **B** una particolarità delle cellule basali positive è la presenza di una stretta estroflessione citoplasmatica (*freccie*) diretta verso il lume follicolare e frammista a cellule apicali negative. **C** quasi tutte le cellule follicolari basali immunoreattive all'OX1R hanno nel loro citoplasma materiale granulare positivo. **D** l'immagine mostra un'invaginazione dell'epitelio prostatico caratterizzato da numerose cellule basali positive. La *freccia* indica un piccolo gruppo di cellule apicali poco positive poste a contatto con il fluido follicolare. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 20 µm.

Tavola 22. Espressione degli mRNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R nella prostata normale ed iperplastica (A,B) ed espressione dell'OX1R nella linea cellulare coltivata in vitro PNT1A (C). A RT-PCR. Canale 1, markers di DNA a peso molecolare noti. Canale 2, mRNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R nell'omogenato di cervello di ratto (controllo positivo). Canale 3, mRNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R nella prostata umana normale ed iperplastica, rispettivamente. Canale 5, controllo negativo. Nel pannello **A** è mostrata l'espressione del trascritto per la β -actina, usata come controllo interno. **B Western**

Blotting. Canale 1, omogenato di cervello di ratto (controllo positivo). Canali 2 e 3, omogenati di prostata normale ed iperplastica, rispettivamente. Canale 4, omogenati di prostata normale ed iperplastica trattati con gli anticorpi diretti contro la prepro-orexina e l'OX1R e pre-incubati con il loro peptidi di controllo (controllo negativo). **C Western Blotting su PNT1A.** Canale 1, omogenato di cervello di ratto. Canale 2, omogenato di lisato cellulare. Canale 3, lisato cellulare trattato con l'anticorpo diretto contro l'OX1R pre-incubato con il peptide di controllo (controllo negativo). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa, i blot dei pannelli **B** e **C** sono stati strippati e reincubati con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannelli inferiori). I markers indicanti il peso molecolare sono collocati sulla sinistra.

Tavola 23. Effetti di diverse concentrazioni di OxA sulla linea cellulare PNT1A. A Risultati del saggio di proliferazione cellulare MTT. I dati sono espressi come media \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti, sono riportati come percentuale di sopravvivenza cellulare rispetto alle cellule di controllo, dopo 24 ore di incubazione con OxA. **B Produzione di cAMP indotta dall'OxA a diversi intervalli di tempo.** I dati sono espressi come media \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti: 0.5 ore alla concentrazione di 10^{-6} M rispetto

al controllo, $P < 0.05$; 1 ora di incubazione per ciascuna dose paragonata al controllo, $P < 0.05$, 2 ore alla concentrazione di 10^{-7} , 10^{-6} M paragonata al controllo, $P < 0.05$. **C Rilascio del Ca^{++} intracellulare indotto da diverse concentrazioni di OxA.** Il controllo è stato ottenuto incubando le cellule in un medium privo di Ca^{++} . Il carbacolo alla concentrazione di 10^{-6} M è stato utilizzato come controllo positivo. I dati sono espressi come media \pm SEM di quattro esperimenti indipendenti. Tutti i gruppi di esperimenti hanno un valore di $P < 0.05$ rispetto al controllo.

Tavola 24. Analisi immunoistochimica dell'OxA su sezioni incluse in paraffina di cancro prostatico. a-d le sezioni sono rappresentative di un alto grado di malignità. Le cellule positive sono sparse nel tessuto neoplastico (**b**) oppure distribuite in un gran numero di follicoli (**a,c,d**). **c,d** il materiale positivo all'OxA nel citoplasma delle cellule follicolari appare chiaramente visibile a maggior ingrandimento. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 20 μm .

Tavola 25. Analisi immunoistochimica dell'OX1R su sezioni incluse in paraffina di cancro prostatico. a-d le sezioni sono rappresentative di un alto grado di malignità. Alcune cellule appaiono

isolate nell'ambito del tessuto neoplastico (**a,b**) mentre altre sono disposte in piccoli gruppi (**c,d**). L'aspetto dell'epitelio delle cellule positive è chiaro nonostante si sia perso l'assetto originario del tessuto. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. Barre micrometriche: 20 μ m.

Tavola 26. Espressione della prepro-orexina e dell'OX1R in campioni di cancro prostatico ed over-espressione dell'OX1R indotta dall'OxA sulla linea cellulare carcinomatosa LNCaP. A RT-PCR. Canale 1, markers di DNA a peso molecolare noti. Canale 2, mRNA codificanti per la prepro-orexina (parte superiore) e per l'OX1R nell'omogenato di cervello di ratto (controllo positivo). Canale 3, mRNA codificanti per la prepro-orexina e per l'OX1R nel carcinoma prostatico. Canale 4, controllo negativo. Nel pannello A è mostrata l'espressione del trascritto per la β -actina, usata come controllo interno. **B Western Blotting.** Canale 1, omogenato di cervello di ratto (controllo positivo). Canale 2, omogenato di cancro prostatico. Canale 3, omogenato di cancro prostatico trattato con gli anticorpi diretti contro la prepro-orexina e l'OX1R pre-incubati con i loro peptidi di controllo (controllo negativo). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa, il blot è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-

tubulina (parte inferiore del pannello). I markers indicanti il peso molecolare sono collocati sulla sinistra. **C L'espressione dell'mRNA codificante per l'OX1R è stata misurata mediante tecnica di real time PCR sulla linea cellulare neoplastica LNCaP non trattata (Ctrl) e trattata con l'OxA (10^{-7} M).** I livelli di mRNA codificante per l'OX1R sono stati espressi in u.a.. ** $P < 0.01$. Come verifica dei dati riportati nei pannelli A, B e C sono stati eseguiti quattro esperimenti nelle medesime condizioni.

Tavola 27. Effetti dell'esposizione all'OxA sulla linea cellulare neoplastica LNCaP. A Saggio di proliferazione cellulare MTT. Le cellule sono state dapprima piastrate per 24 ore e successivamente esposte a concentrazioni crescenti di OxA per altre 24 ore. Dopo l'incubazione, la soluzione MTT è stata aggiunta alle cellule che successivamente sono state incubate per 4 ore a 37°C. Durante la fase finale dell'esperimento, i cristalli di formazan non stati dissolti e ne è stata misurata l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 570 nm. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti mediante il metodo di esclusione al trypan blue. **B Livelli di Ca^{++} intracitoplasmatico nella linea cellulare neoplastica LNCaP trattata con diverse concentrazioni di OxA. C Livelli di cAMP nella linea cellulare LNCaP a diverse concentrazioni di OxA.** I dati riportati nei pannelli

A, B e C rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Il diagramma di bar rappresenta la media \pm SE di quattro esperimenti. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Tavola 28. Effetti dell'OxA sulla traslocazione nucleare degli AR sulla linea cellulare neoplastica LNCaP in assenza e presenza di concentrazioni fisiologiche di T (10^{-9} M). Differenti concentrazioni di OxA (da 10^{-10} fino a 10^{-6} M) non determinano alcuna traslocazione nucleare su cellule native rispetto al controllo. Al contrario tutte le concentrazioni del peptide determinano una riduzione significativa della traslocazione nucleare degli AR dopo pre-trattamento delle cellule con T. I dati riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Il diagramma di bar rappresenta la media \pm SE di quattro esperimenti. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ (rispetto ai campioni trattati con T).

7. BIBLIOGRAFIA

AgoulNIK I.U., Weigel N.L. Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006; 99: 362-72.

Al-Barazanji K.A., Wilson S., Baker J., Jessop D.S., Harbuz M.S. Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 421-424.

Alexandre A., Hautot C., Mehio M., Jeandel L., Courel M., Voisin T., Couvineau A., Gobet F., Leprince J., Pfister C., Anouar Y., Chartrel N. The orexin type 1 receptor is overexpressed in advanced prostate cancer with a neuroendocrine differentiation, and mediates apoptosis. *Eur J Canc* 2014; 50: 2126-2133.

Ammoun S., Holmqvist T., Shariatmadari R., Oonk H.B., Detheux M., Parmentier M., Akerman K.E., Kukkonen J.P. Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J. Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 507-514.

Ammoun S., Lindholm D., Wootz H., Akerman K.E., Kukkonen J.P. G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce

caspase-dependent and-independent cell death through p38 mitogen-
/stress- activated protein-kinase. J Biol Chem 2006; 281: 834-841.

Annerbrink K., Westberg L., Olsson M., Andersch S., Sjodin I.,
Holm G., Allgulander C., Eriksson E. Panic disorder is associated
with the Val308Iso polymorphism in the hypocretin receptor gene.
Psychiatr Genet 2011; 21: 85–89.

Arihara Z., Takahashi K., Murakami O., Totsune K., Sone M., Satoh
F., Ito S., Mouri T. Immunoreactive orexin-A in human plasma.
Peptides 2001; 22: 139-142.

Backberg M., Hervieu G., Wilson S., Meister B. Orexin receptor-1
(OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the
hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food
and water intake. Eur J Neurosci 2002; 15: 315-328.

Barreiro M.L., Pineda R., Gaytan F., Archanco M., Burrell M.A.,
Castellano J.M., Hakovirta H., Nurmio M., Pinilla L., Aguilar E.,
Toppari J., Dieguez C., Tena-Sempere M. Pattern of orexin
expression and direct biological actions of orexin-A in the rat testis.
Endocrinology 2005; 146: 5164-5175.

Barriero M.L., Pineda R., Navarro V.M., Lopez M., Souminen J.S.,
Pinilla L., Senaris R., Toppari J., Aguilar E., Dieguez C., M. Tena-
Sempere M. Orexin 1 receptor messenger ribonucleic acid

expression and stimulation of testosterone secretion by orexin A in rat testis. *Endocrinology* 2004; 145: 2297-2306.

Beiras-Fernandez A., Gallego R., Blanco M., Garcia-Caballero T., Diégez C., Beiras A. Merkel cells, a new localization of prepro-orexin and orexin receptors. *J Anat* 2004; 204: 117-122.

Biegańska K., Sokołowska P., Jöhren O., Zawilska J.B. Orexin A suppresses the growth of rat C6 glioma cells via a caspase-dependent mechanism. *J Mol Neurosci* 2012;48: 706-12.

Bingham S., Davey P.T., Babbs A.J., Irving E.A., Sammons M.J., Wyles M., Jeffrey P., Cutler L., Riba I., Johns A., Porter R.A., Upton N., Hunter A.J., Parsons A.A. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 2001; 92: 81-90.

Blanco M., Garcia-Caballero T., Callego R., Dieguez C., Beiras A. Cellular localization of orexins in human anterior pituitary. *Histochem Cell Biol* 2003; 120: 259-264.

Blanco M., García-Caballero T., Fraga M., Gallego R., Cuevas J., Forteza J., Beiras A., Diéguez C. Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept* 2002; 104: 161-165.

Blanco M., López M., García-Caballero T., Gallego R., Vázquez-Boquete A., Morel G., SeñarIs R., Casanueva F., Diéguez C., Beiras

A. Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1616-1619.

Bravo P.W., Skidmore J.A., Zhao X.X. Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 173-93.

Brian S. D., Cox H.M. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 202–211.

Briski K.P., Sylvester P.W. Hypothalamic orexin-A-immunopositive neurons express Fos in response to central glucopenia. *Neuroreport* 2001; 12: 531-534.

Brown D., Montesano R. Membrane specialization in the rat epididymis. I. Rod-shaped intramembrane particles in the apical (mitochondria-rich) cell. *J Cell Sci* 1980; 45: 187–198.

Burdyga G., Lal S., Spiller D., Jiang W., Thompson D., Attwood S., Saeed S., Grundy D., Varro A., Dimaline R., Dockray G.J. Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans. *Gastroenterology* 2003; 124: 129-139.

Casas H., San Martin M., Copaira M. Aspectos histologicos testiculo de la alpaca (*Lama pacos*). *Rev Fac Med Vet, Lima*. 1993–1996; 18–20: 233–238.

Cataldi N.I., Lux-Lantos V.A., Libertun C. Effects of orexins A and B on expression of orexin receptors and progesterone release in luteal and granulosa ovarian cells. *Regul Pept* 2012; 178: 56-63.

Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98:437-451.

Chen C.T., Dun S.L., Kwok E.H., Dun N.J., Chang J.K. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 1999; 260: 161-164.

Chen J., Randeve H.S. Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2790-2804.

Chen L., Zhao Y., Zheng D., Ju S., Shen Y., Guo L. Orexin A affects INS-1 rat insulinoma cell proliferation via orexin receptor 1 and the AKT signaling pathway. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 854623.

Cheng S.B., Kuchiiwa S., Gao H.Z., Kuchiiwa T., Nakagawa S. Morphological study of orexin neurons in the hypothalamus of the Long-Evans rat, with special reference to co-expression of orexin

and NADPH-diaphorase or nitric oxide synthase activities. *Neurosci Res* 2003; 46: 53-62.

Chow B. K. C., Cheung K.H., Tsang E.M.W, Leung M.C.T., Lee S.M.Y., Wong P.Y.D. Secretin controls anion secretion in the rat epididymis in an autocrine/paracrine fashion. *Biol Reprod* 2004; 70: 1594–1599.

Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat* 1966; 118: 509-24.

Clermont Y., Tang X.M. Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anat Rec* 1985; 213: 33-43.

Cornwall G. A. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 213–227.

Cutler D.J., Morris R., Sheridhar V., Wattam T.A., Holmes S., Patel S., Arch J.R., Wilson S., Buckingham R.E., Evans M.L., Leslie R.A., Williams G. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 1999; 20: 1455-1470.

D’Anna K.L., Gammie S.C. Hypocretin-1-dose-dependently modulates maternal behaviour in mice. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 553-566.

Dall'Aglia C., Pascucci L., Mercati F., Polisca A., Ceccarelli P., Boiti C. Immunohistochemical detection of the orexin system in the placenta of cats. *Res Vet Sci* 2012; 92: 362-5.

Dall'Aglia C., Polisca A., Troisi A., Zelli R., Ceccarelli P. Immunohistochemical localization of orexin A and orexin type 2 receptor-positive cells in the placenta of dogs. *Acta Histochem* 2014; 116: 989-92.

Darker J.G., Porter R.A., Eggleston D.S., Smart D., Brough S.J., Sabido-David C., Jerman J.C. Structure–activity analysis of truncated orexin-A analogues at the orexin-1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 737-740.

Date Y., Mondal M.A., Matsuhara S., Ueta Y., Yamashita H., Kaiya H., Kangawa K., Nakazato M. Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Mol Brain Res* 2000; 76: 1-6.

Date Y., Ueta Y., Yamashita H., Yamaguchi H., Matsukura S., Kangawa K., Sakurai T., Yanagisawa M., Nakazato M. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 748-753.

Davidoff M.S., Breucker H., Holstein A.F., Seidi K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1990; 262: 254-61

Davidoff M.S., Shulze W., Middendorff R., Holstein A.F. The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* 1993; 271: 429-39.

de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L., Gautvik V.T., Bartlett II F.S., Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 322-327.

De Santis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., Siegel R.L., Stein K.D., Kramer J.L., Alteri R., Robbins A.S., Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin* 2014;64: 252-271.

Dehan P., Canon C., Trooskens G., Rehli M., Munaut C., Van Criekinge W., Delvenne P. Expression of type 2 orexin receptor in human endometrium and its epigenetic silencing in endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 1549-57.

Dehlon G., von Lawzewitsch I. Ductus epididymis compartment and morphology of epididymal spermatozoa in llamas. *Anat Histol Embryol* 1994; 23: 217–225.

Di Fiore M.M., Assisi L., Botte V., D’Aniello A. D-Aspartic acid is implicated in the control of testosterone production by the vertebrate gonad. Studies on the female green frog, *Rana esculenta*. *J Endocrinol* 1998; 57: 199–207.

Ehrström M., Gustafsson T., Finn A., Kirchgessner A., Grybäck P., Jacobsson H., Hellström P.M., Näslund E. Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2370-2377.

El-Alfy M., Pelletier G., Hermo L.S., Labrie F. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech* 2000; 51: 436-46.

Fabris C., Cozzi B., Hay-Schmidt A., Naver B., Møller M. Demonstration of an orexinergic central innervation of the pineal gland of the pig. *J Comp Neurol* 2004; 471: 113-127.

Fadel J., Deutch A.Y. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2002; 111: 379-387.

Farr S.A., Banks W.A., Kumar V.B., Morley J.E. Orexin-A-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptide* 2005; 26: 759-765.

Ferguson A.V., Samson W.K. The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Front. Neuroendocrinol* 2003; 24: 141-150.

Fouquet J.P., Kann M.L. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol Cell* 1994; 81: 89-93.

Fowler M.E. Medicine and surgery of South American camelids llama, alpaca, vicuna, guanaco, Iowa State University Press, second ed., 1998.

Fowler M.E. Feeding and nutrition. In: Fowler ME (Ed). Medicine and surgery of camelids. Terza ed. Ames: Blackwell Publishing; 2010; 17-58.

Fujiki N., Yoshida Y., Ripley B., Mignot E., Nishino S. Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. Sleep 2003; 26: 953–959.

Goldstein AS1, Huang J, Guo C, Garraway IP, Witte ON. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. Science 2010; 329: 568-71.

Greco M.A., Shiromani P.J. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. Brain Res Mol Brain Res 2001; 88: 176-182.

Griffond B., Risold P.Y., Jacquemard C., Colard C., Fellmann D. Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. Neurosci Lett 1999; 262: 77-80.

Grossmann M., Cheung A.S., Zajac J.D. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27: 603–616.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440–3450.

Gulia K.K., Mallick H.N., Kumar V.M. Orexin A (hypocretin-1) application at the medial preoptic area potentiates male sexual behaviour in rats. *Lett Neurosci* 2002; 116: 921-923.

Hakansson M., de Lecea L., Sutcliffe J.G., Yanagisawa M., Meister B. Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 653-663.

Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 2001; 30: 345-54

Harris D.M., Go V.L., Reeve J.R. Jr, Wu S.V. Stimulation of amylase release by Orexin is mediated by Orexin 2 receptor in AR42J cells. *Pancreas* 2002; 25: 405-10.

Hervieu G.J., Cluderay J.E., Harrison D.C., Roberts J.C., Leslie R.A.
Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in
the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 2001; 103: 777-797.

Hess R.A. 1998. Spermatogenesis, overview. In: Knobil E, Neill JD,
editors. *Encyclopedia of Reproduction* vol.4, San Diego: Academic
Press. pp 539-545.

Hilairt S., Bouaboula M., Carriere D., Le Fur G., Casellas P.
Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor:
evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist,
SR141716. *J Biol Chem* 2003; 278: 23731–23737.

Hirota K., Kushikata T., Kudo M., et al. Orexin A and B evoke
noradrenaline release from rat cerebrocortical slices. *Br J Pharmacol*
2001; 134: 1461-1466.

Holmqvist T., Åkerman K.E.O., Kukkonen J.P. High specificity of
Holstein A.F., Maekawa M., Nagano T., Davidoff M.S.
Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules
are dynamic structures of heterogenous phenotype. *Arch Histol*
Cytol 1996; 59: 109-125.

Horvath T.L., Peyron C., Diano S., Ivanov A., Aston-Jones G.,
Kilduff T.S., van Den Pol A.N. Hypocretin (orexin) activation and
synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J*
Comp Neurol 1999; 415: 145-159.

Hwang L.L., Chen T.D., Dun N.J. Mechanisms of orexin-induced depolarizations in the rat dorsal motor nucleus of vagus neurones in vitro. *J Physiol* 2001; 537: 511-520.

Ida T., Nakahara K., Murakami T., Hanada R., Nakazato M., Murakami N. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 318-323.

Ito N., Yabe T., Gamo Y., Nagai T., Oikawa T., Yamada H., Hanawa T. I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *Neuroscience* 2008; 157: 720-32.

Johansson L., Ekholm M.E., Kukkonen J.P. Multiple phospholipase activation by OX(1) orexin/hypocretin receptors. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:1948–1956.

Johansson L., Ekholm M.E., Kukkonen J.P. Regulation of OX1 orexin/hypocretin receptor-coupling to phospholipase C by Ca²⁺influx. *Br J Pharmacol* 2007;150: 97–104.

Jöhren O., Neidert S.J., Kummer M., Dendorfer A., Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 2001; 142: 3324-3331.

Ju S.J., Zhao Y., Chang X., Guo L. Orexin A protects cells from apoptosis by regulating FoxO1 and mTORC1 through the

OX1R/PI3K/AKT signaling pathway in hepatocytes. *Int J Mol Med* 2014; 34: 153-159.

Kane J.K., Tanaka H., Parker S.L., Yanagisawa M., Li M.D. Sensitivity of orexin-A binding to phospholipase C inhibitors, neuropeptide Y, and secretin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 959-65.

Karteris E., Chen J., Randeva H.S. Expression of human prepro-orexin and signalling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1957-1962.

Karteris E., Chen J., Randeva H.S. Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1957–1962.

Karteris E., Machado R.J., Chen J., Zervou S., Hillhouse E.W., Randeva H.S. Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signalling in the rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E1089–E1100.

Kawada Y., Ueno S., Asayama K., Tsutsui M., Utsunomiya K., Toyohira Y., Morisada N., Tanaka K., Shirahata A., Yanagihara N. Stimulation of catecholamine synthesis by orexin-A in bovine adrenal medullary cells through orexin receptor 1. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 141-147.

Kirchgessner A.L. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev* 2002; 23: 1–15.

Kirchgessner A.L., Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 1999; 24: 941-951.

Kishida M., Ishige K., Horibe T., Tada N., Koibuchi N., Shoda J., Kita K., Kawakami K. Orexin 2 receptor as a potential target for immunotoxin and antibody-drug conjugate cancer therapy. *Oncol Lett* 2012 ;3: 525-529.

Kmiec Z. Central regulation of food intake in ageing. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 7-16.

Kohsaka A., Watanobe H., Kakizaki Y., Suda T., Schioth H.B. A significant participation of orexin-A, a potent orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Brain Res* 2001; 898: 166-170.

Kukkonen J.P., Akerman K.E. Orexin receptors couple to Ca²⁺ channels different from store-operated Ca²⁺ channels. *Neuroreport* 2001; 12: 2017-2001.

Kukkonen J.P., Holmqvist T., Ammoun S., Akerman K.E. Functions of the orexigenic/hypocretinergeric system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 283: C1567-1591.

Kunii K., Yamanaka A., Nambu T., Matsuzaki I., Goto K., Sakurai T. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 1999; 842: 256-261.

La Manna C., Assisi L., Vittoria A., Botte V., Di Fiore M.M. D-Aspartic acid and nitric oxide as regulators of androgen production in boar testis. *Theriogenology* 2007; 67: 249-254.

Laburthe M., Voisin T. The orexin receptor OX1R in colon cancer: a promising therapeutic target and a new paradigm in G protein-coupled receptor signaling through ITIMs. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 1678-1687.

Larsson K P., Peltonen H.M., Bart G., Louhivuori L.M., Penttonen A., Antikainen M., Kukkonen J.P., Akerman K.E. Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *J Biol Chem* 2005; 280: 1771-81.

Lawson D.A., Zong Y., Memarzadeh S., Xin L., Huang J., Witte O.N. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2610-5.

Leung A.Y.H., Leung P.Y., Cheng-Chew S.B., Wong P.Y.D. The role of calcitonin gene-related peptide in the regulation of anion secretion by the rat and human epididymis. *J Endocrinol* 1992; 133: 259–268.

Leung P. S., Wong T.P., Wong P.Y.D., Chan H.C. Localization and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat epididymis. *Cell Biol Int* 1998; 22: 193–198.

Lopez M., Senaris R., Gallego R., Garcia-Caballero T., Lago F., Seoane L., Casanueva F., Dieguez C. Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology* 1999; 140: 5991–5994.

López M., Seoane L.M., Tovar S., Nogueiras R., Diéguez C., Señarís R. Orexin-A regulates growth hormone-releasing hormone mRNA content in a nucleus-specific manner and somatostatin mRNA content in a growth hormone-dependent fashion in the rat hypothalamus. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 2080-2088.

Lu X.Y., Bagnol D., Burke S., Akil H., Watson S.J. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 2000; 37: 335-344.

Lu Z., Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 2006; 58: 621-631.

Lubkin M., Stricker-Krongrand A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 241-245.

Lund P.E., Shariatmadari R., Uustare A., Detheux M., Parmentier M., Kukkonen J.P., Åkerman K.E.O. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca^{2+} influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 2000; 275: 30806–30812.

Lund P.E., Shariatmadari R., Uustare A., et al. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca^{2+} influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 2000; 275: 30806-30812.

Malendowicz L.K., Jedrzejczak N., Belloni A.S., Trejter M., Hochól A., Nussdorfer G.G. Effects of orexins A and B on the secretory and proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal glands. *Histol Histopathol* 2001; 16: 713-717.

Malendowicz W., Szyszka M., Ziolkowska A., Rucinski M., Kwias Z. Elevated expression of orexin receptor 2 (HCRTR2) in benign prostatic hyperplasia is accompanied by lowered serum orexin A concentrations. *Int J Mol Med* 2011; 27: 377-83.

Malherbe P., Borroni E., Gobbi L., Knust H., Nettekoven M., Pinard E., Roche O., Rogers-Evans M., Wettstein J.G., Moreau J.L. Biochemical and behavioural characterization of EMPA, a novel high-affinity, selective antagonist for the OX2 receptor. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 1326–1341.

Marcus J.N., Aschkenosi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., Elmquist J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 435: 6-25.

Mark M.D., Herlitze S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5830-6.

Martyńska L., Polkowska J., Wolinska-Witort E., Chmielowska M., Wasilewska-Dziubinska E., Bik W., Baranowska B. Orexin A and its role in the regulation of the hypothalamo-pituitary axes in the rat. *Reprod Biol* 2006; 6: 29-35.

Matsuki T., Sakurai T. Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology. *Results Probl Cell Differ* 2008; 46: 27-55.

Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Gottardo L., Aragona F., Nussdorfer G.G. Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 2001a; 86: 778-782.

Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Gottardo L., Aragona F., Nussdorfer G.G. Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of adenylate cyclase-dependent signalling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 2001b; 86: 778-782.

Meerabux J., Iwayama Y., Sakurai T., Ohba H., Toyota T., Yamada K., Nagata R., Irukayama-Tomobe Y., Shimizu H., Yoshitsugu K., Ohta K., Yoshikawa T. Association of an orexin 1 receptor 408Val variant with polydipsia-hyponatremia in schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 401–407.

Mercer J.G., Speakman J.R. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 101-116.

Middendorff R., Muller D., Mewe M., Mukhopadhyay A.K., Holstein A.F., Davidoff M.S. The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3486-99.

Mignot E., Lammers G.J., Ripley B., Okun M., Nevsimalova S., Overeem S., Vankova J., Black J., Harsh J., Bassetti C., Schrader H., Nishino S. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002; 59: 1553-1562.

Mikkelsen J.D., Hauser F., deLecea L., Sutcliffe J.G., Kilduff T.S., Calgari C., Pévet P., Simonneaux V. Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 419-425.

Mileykovskiy B.Y., Kiyashchenko L.I., Siegel J.M. Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2480-2489.

Mitsuma T., Hirooka Y., Kayama M., Mori Y., Yokoi Y., Rhue N., Ping J., Izumi M., Ikai R., Adachi K., Nogimori T. Radioimmunoassay for orexin A. *Life Sci* 2000a; 66: 897-904.

Mitsuma T., Hirooka Y., Kayma M., Mori Y., Yokoi Y., Izumi M., Rhue N., Ping J., Adachi K., Ikai R., Kawai N., Nakayashiki A., Nogimori T. Radioimmunoassay for hypocretin-2. *Endocr Regul* 2000b; 34: 23-27.

Miyasaka K., Masuda M., Kanai S., Sato N., Kurosawa M., Funakoshi A. Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. *Pancreas* 2002; 25: 400-404.

Moore R.Y., Abrahamson E.A., Van Den Pol A. The hypocretin neuron system: an arousal system in the human brain. *Arch Ital Biol* 2001; 139: 195-205.

Muschamp J.W., Dominguez J.M., Sato S.M., Shen R.Y., Hull E.M. A role for hypocretin (orexin) in male sexual behaviour. *J Neurosci* 2007; 27: 2837-2845.

Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T.,

Sasano H. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 205: 43-50.

Nambu T., Sakurai T., Mizukami K., Hosoya Y., Yanagisawa M., Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 1999; 827: 243-260.

Näslund E., Ehrström M., Ma J., Hellström P.M., Kirchgessner A.L. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G470-479.

Nitkiewicz A., Smolinska N., Maleszka A., Chojnowska K., Kaminski T. Expression of orexins and their precursor in the porcine ovary and the influence of orexins on ovarian steroidogenesis in pigs. *Anim Reprod Sci* 2014; 148: 53-62.

Nitkiewicz A., Smolinska N., Maleszka A., Kiezun M., Kaminski T. Localization of orexin A and orexin B in the porcine uterus. *Reprod Biol* 2012; 12: 135-55.

Nitkiewicz A., Smolinska N., Przala J., Kaminski T. Expression of orexin receptors 1 (OX1R) and 2 (OX2R) in the porcine ovary during the oestrous cycle. *Regul Pept* 2010; 165: 186-90.

Nokura K., Kanbayashi T., Ozeki T., Koga H., Zettsu T., Yamamoto H., Ozaki N., Shimizu T., Kawase T. Hypersomnia, asterixis and

cataplexy in association with orexin A-reduced hypothalamic tumor.

J Neurol 2004; 251: 1534-5.

Nouri M., Ratther E., Stylianou N., Nelson C.C., Hollier B.G., Williams E.D. Androgentargeted therapy-induced epithelial mesenchymal plasticity and neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer: an opportunity for intervention. Front Oncol 2014; 4: 370.

Nowak K.W., Mackowiak P., Switonska M.M., Fabis M., Malendowicz L.K. Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. Life Sci 2000; 66: 449-454.

Ohkubo T., Tsukada A., Shamoto K. cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. J Mol Endocrinol 2003; 31: 499-508.

Okumura T., Takeuchi S., Motomura W., Yamada H., Egashira Si S., Asahi S., Kanatani A., Ihara M., Kohgo Y. Requirement of intact disulfide bonds in orexin-A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. Biochem. Biophys. Res Commun 2001; 280: 976-981.

Olafsdottir B.R., Rye D.B., Scammell T.E., Matheson J.K., Stefansson K., Gulcher J.R. Polymorphisms in hypocretin/orexin pathway genes and narcolepsy. Neurology 2001; 57: 1896–1899.

Osorio E., San Martin M. Aspecto histologico del epididimo, conducto deferente y glandulas sexuales accesorias del aparato reproductor musculino de la alpaca (*Glama lama pacos*). Arch Inst Biol Andina 1966; 1: 128–141.

Parillo F., Verini Supplizi A., Macrì D., Catone G. The ductus epididymis of the alpaca: immunohistochemical and lectin histochemical study. Reprod Domest Anim 2009; 44: 284–294.

Pavone L.M., Tafuri S., Avallone L., Staiano N., Vittoria A. Expression of the orexin A and its receptor 1 in the vestibular glands of the cattle genital tract. Anat Rec 2009; 292: 202-206.

Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R., Hungs M., Pedrazzoli M., Padigar M., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcolaptic brains. Nat Med 2000; 6: 991-997.

Pu S., Jain M.R., Kalra P.S., Kalra S.P. Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. Regul Pept 1998; 78: 133-136.

Rainero I., Gallone S., Rubino E., Ponzio P., Valfre W., Binello E., Fenoglio P., Gentile S., Anoaica M., Gasparini M., Pinessi L.

Haplotype analysis confirms the association between the HCRTR2 gene and cluster headache. *Headache* 2008; 48: 1108–1114.

Rainero I., Ostacoli L., Rubino E., Gallone S., Picci L.R., Fenoglio P., Negro E., Rosso C., De Martino P., De Marchi M., Furlan P.M., Pinessi L. Association between major mood disorders and the hypocretin receptor 1 gene. *J Affect Disord* 2011; 130: 487–491.

Ramanjaneya M., Conner A.C., Chen J., Kumar P., Brown J.E., Jöhren O., Lehnert H., Stanfield P.R., Randeva H.S. Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B. *J Endocrinol* 2009; 202: 249-261.

Randeva H.S., Karteris E., Grammatopoulos D., Hillhouse E.W. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4808-4813.

Regadera J., Cobo P., Paniaqua R., Martinez-García F., Palacios J., Nistal M. Immunohistochemical and semiquantitative study of the apical mitochondria-rich cells of the human prepubertal and adult epididymis. *J Anat* 1993; 183: 507–514.

Rodgers R.J., Halford J.C., Nunes de Souza R.L., Canto de Souza A.L., Piper D.C., Arch J.R., Upton N., Porter R.A., Johns A., Blundell J.E. SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist,

enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1444-1452.

Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66: 105-143.

Rouet-Benzineb P., Rouyer-Fessard C., Jarry A., Avondo V., Pouzet C., Yanagisawa M., Laboisie C., Laburthe M., Voisin T. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 45875-45886.

Ruiz-Bejar J.A. Manejo del calendario alpaquero. In: Ruiz-Bejar JA (Ed). *Producción y tecnología en camélidos sudamericanos*. Prima edizione, Huancavelica, Perú. 2011; 33-58.

Russell L.D., Griswold M.D. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater FL. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 517.

Russell S.H., Kim M.S., Small C.J., Abbott C.R., Morgan D.G., Taheri S., Murphy K.G., Todd J.F., Ghatei M.A., Bloom S.R. Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1213-8.

Russell S.H., Small C.J., Dakin C.L., Abbott C.R., Morgan D.G., Ghatei M.A., Bloom S.R. The central effects of orexin-A in the

hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats.

J Neuroendocrinol 2001a; 13: 561-566.

Russell S.H., Small C.J., Kennedy A.R., Stanley S.A., Seth A., Murphy K.G., Taheri S., Ghatei M.A., Bloom S.R. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. Endocrinology 2001b; 142: 5294-5302.

Russo F., Pavone L.M., Tafuri S., Avallone L., Staiano N., Vittoria A. Expression of orexin A and its receptor 1 in the bovine urethroprostatic complex. Anat Rec 2008; 291:169-174.

Sakurai T. Reverse pharmacology of orexin: from an orphan GPCR to integrative physiology. Regulat Pept 2005; 126: 3-10.

Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terret J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. Cell 1998; 92: 573-585.

Sanchez de Miguel M.J., Burrell M.A. Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of developing mouse gut. J. Histochem Cytochem 2002; 50: 63-70.

Satoh Y., Uchida M., Fujita A., Nishio H., Takeuchi T., Hata F.
Possible role of orexin A in nonadrenergic, noncholinergic
inhibitory response of muscle of the mouse small intestine. *Eur J
Pharmacol* 2001; 428: 337-342.

Savaskan E., Muller-Spahn F., Meier F., Wirz-Justice A., Meyer P.
Orexins and their receptors in the human retina. *Pathobiology* 2004;
7: 211-216.

Sellayah D., Bharaj P., Sikder D. Orexin is required for brown
adipose tissue development, differentiation, and function. *Cell
Metab* 2011; 14: 478–490.

Seoane L.M., Tovar S.A., Perez D., Mallo F., Lopez M., Señaris R.,
Casanueva F.F., Dieguez C. Orexin A suppresses in vivo GH
secretion. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 731-736.

Shafi A.A., Yen A.E., Weigel N.L. Androgen receptors in hormone-
dependent and castrationresistant prostate cancer. *Pharmacol Ther*
2013; 140: 223-238.

Sharifi N., Auchus R.J. Steroid biosynthesis and prostate cancer.
Steroids 2012; 77: 719-726.

Shibahara M., Sakurai T., Nambu T., Takenouchi T., Iwaasa H.,
Egashira S.I., Ihara M., Goto K. Structure, tissue distribution and
pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides*
1999; 20: 1169-1176.

Silveyra P., Lux-Lantos V., Libertun C. Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E977-985.

Skrzypski M., Kaczmarek P., Le T.T., Wojciechowicz T., Pruszyńska-Oszmalek E., Szczepankiewicz D., Sassek M., Arafat A., Wiedenmann B., Nowak K.W., Strowski M.Z. Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS Lett* 2012; 586: 4157-64.

Smart D., Jerman J.C., Brough S.J., Rushton S.L., Murdock P.R., Jewitt F., Elshourbagy N.A., Ellis C.E., Middlemiss D.N., Brown F. Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1–3.

Spinazzi R., Andreis P.G., Rossi G.P., Nussdorfer G.G. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 46–57.

Spinazzi R., Rucinski M., Neri G., Malendowicz L.K., Nussdorfer G.G. Preproorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro

cortisol secretion and growth of tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005a; 90: 3544-3549.

Spinazzi R., Ziolkowska A., Neri G., et al. Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med* 2005b; 15: 847-852.

Stelletta C., D'Alterio G.L., Juyena N.S., Steiger R., Bevilacqua F. Health and reproductive monitoring in alpaca (*Lama pacos*) herd in central Italy. 17th International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants. 27-30 Maggio 2009; Perugia, Italy.

Tafari S., Muto R.L., Pavone L.M., Valiante S., Costagliola A., Staiano N., Vittoria A. Novel localization of orexin A in the tubular cytotypes of the rat testis. *Regul Pept* 2010; 164: 53–57.

Tafari S., Pavone L.M., Lo Muto R., Basile M., Langella E., Fiorillo E., Avallone L., Staiano N., Vittoria A. Expression of orexin A and its receptor 1 in the rat epididymis. *Regul Pept* 2009; 155: 1-5.

Taheri S., Bloom S. Orexins/hypocretins: waking up the scientific world. *Clin Endocrinol* 2001; 54: 421-429.

Taheri S., Mahmoodi M., Opacka-Juffry J., Ghatei M.A., Bloom S.R. Distribution and quantification of immunoreactive orexin A in rat tissues. *FEBS Lett* 1999; 457: 157-161.

Takahashi K., Arihara Z., Suzuki T., Sone M., Kikuchi K., Sasano H., Murakami O., Totsune K. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A like immunoreactivity in human urine. *Peptides* 2006; 27: 871-877.

Takahashi K., Arihara Z., Suzuki T., Sone M., Kikuchi K., Sasano H., Murakami O., Totsune K. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides* 2006; 27: 871-7.

Takano S., Kanai S., Hosoya H., Ohta M., Uematsu H., Miyasaka K. Orexin-A does not stimulate food intake in old rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2004; 287: 1182-1187.

Tang J., Chen J., Ramanjaneya M., Punna A., Conner A.C., Randeva H.S. The signalling profile of recombinant human orexin-2 receptor. *Cell Signal* 2008; 20: 1651–1661.

Teixeira J., Fynn-Thompson E., Payne A.H., Donahoe P.K. Müllerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. *Endocrinology* 1999; 140: 4732-8.

Thannickal T.C., Moore R.Y., Nienhuis R., Ramanathan L., Gulyani S., Aldrich M., Cornford M., Siegel J.M. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000; 27: 469-474.

Thorne-Tjomsland G., Clermont Y., Hermo L. Contribution of the Golgi apparatus components to the formation of the acrosomic system and chromatoid body in rat spermatids. *Anat Rec* 1988; 221: 591-598.

Trivedi P., Yu H., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H., Guan X.M. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 1998; 438: 71-75.

Vaughan J.L., Tibary A. Reproduction in female South American camelids: a review and clinical observations. *Small Rumin Res* 2006; 61: 259-81.

Voisin T., El Firar A., Fasseu M., Rouyer-Fessard C., Descatoire V., Walker F., Paradis V., Bedossa P., Henin D., Lehy T., Laburthe M. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. *Cancer Res* 2011; 71: 3341-3351.

Voisin T., El Firar A., Rouyer-Fessard C., Gratio V., Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *FASEB J* 2008; 22: 1993-2002.

Voisin T., Firar A.E., Avondo V., Laburthe M. Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 4977-4984.

Voisin T., Rouet-Benzineb P., Reuter N., Laburthe M. Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 72-87.

Wang J.B., Murata T., Narita K., Honda K., Higuchi T. Variation in the expression of orexin and orexin receptors in the rat hypothalamus during the estrous cycle, pregnancy, parturition, and lactation. *Endocrine* 2003; 22: 127-34.

Wenzel J., Grabinski N., Knopp C.A., Dendorfer A., Ramanjaneya M., Randeve H.S., Ehrhart-Bornstein M., Dominiak P., Jöhren O. Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R1601-1609

Xu R., Roh S.G., Gong C., et al. Orexin-B augments voltage-gated L-type Ca^{2+} current via protein kinase C-mediated signalling pathway in ovine somatotropes. *Neuroendocrinology* 2003; 77: 141-152.

Xu R., Wang Q., Yan M., et al. Orexin-A augments voltage-gated Ca^{2+} currents and synergistically increases growth hormone (GH)

secretion with GH-releasing hormone in primary cultured ovine somatotropes. *Endocrinology* 2002; 143: 4609-4619.

Yamada H., Okumura T., Motomura W., Kobayashi Y., Kohgo Y. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 527-531.

Yuan X., Cai C., Chen S., Chen S., Yu Z., Balk S.P. Androgen receptor functions in castration resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. *Oncogene* 2014; 33: 2815-25.

Zhang S., Blache D., Vercoe P.E., Adam C.L., Blackberry M.A., Findlay P.A., Eidne K.A., Martin G.B. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regul Pept* 2005; 124: 81-87.

Zhao X.X. in: *Ecophysiology and Reproduction of the Camelidae*. Gansu Science and Technology Press, Lanzhou, Gansu, China; 1995; 222–242.

Zheng D., Zhao Y., Shen Y., Chang X., Ju S., Guo L. Orexin A-mediated stimulation of 3 β -HSD expression and testosterone production through MAPK signaling pathways in primary rat Leydig cells. *J Endocrinol Invest* 2014; 37: 285-292.

Zhou W.L., Leung P.S., Wong T.P., Dun N.J., Wong P.Y.D., Chan H.C. Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary

adenilate cyclase-activating polypeptides. *J Endocrinol* 1997; 154: 389-395.

Zhu Y., Miwa Y., Yamanaka A., Yada T., Shibahara M., Abe Y. Orexin receptor type 1 couples exclusively to pertussin toxin-insensitive G-protein, while orexin receptor type 2 couples to both pertussin toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 2003; 92: 259-266.

Ziolkowska A., Rucinski M., Tyczewska M., Malendowicz L.K. Orexin B inhibits proliferation and stimulates specialized function of cultured rat calvarial osteoblast-like cells. *Int J Mol Med* 2008; 22: 749-755.

Ziolkowska A., Spinazzi R., Albertin G., Nowak M., Malendowicz L.K., Tortorella C., Nussdorfer G.G. Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 96: 423-429.

Zwirska-Korczala K., Adamczyk-Sowa M., Sowa P., Pilc K., Suchanek R., Pierzchala K., Namyslowski G., Misiolek M., Sadowski K., Kato I., Kuwahara A., Zabielski R. Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 1: 53-64.

8. RINGRAZIAMENTI

Dedico questo lavoro di tesi alla mia famiglia che mi è stata accanto e mi ha consentito di raggiungere un ulteriore traguardo della mia vita professionale ed all'amore della mia vita Pio Alessandro che mi rende ogni giorno la donna più felice e serena. Ringrazio in particolar modo il prof. Alfredo Vittoria che si è dimostrato una preziosa "guida" durante il ciclo di dottorato stimolando il mio interesse nella ricerca scientifica e dandomi l'opportunità di accrescere sia il mio "background" scientifico che le mie competenze nel lavoro sperimentale. Ringrazio ancora il prof. Giuseppe Paino ed il prof. Nicola Mirabella per la stima e l'affetto dimostratami nel corso di questi anni meravigliosi. Ringrazio tutti i componenti del gruppo di ricerca coordinato dalla prof. Mirabella, cioè la dott.ssa Caterina Squillacioti, Sabrina Alì ed Antonio Calamo che mi hanno accompagnato durante tutto il mio percorso di studi. Infine, ringrazio il prof. Giuseppe Cringoli, coordinatore del dottorato, il prof. Vincenzo Esposito e tutto il personale docente del Dipartimento, ed il personale tecnico-amministrativo che, sempre presenti ed attivi, mi hanno consentito di esplicare al meglio il ciclo di dottorato.

***"La nostra gloria più grande non sta nel non cadere mai, bensì nel rialzarci
ogni volta che cadiamo"***

9. ELENCO DEI LAVORI PUBBLICATI

1. C. Squillacioti, A. De Luca, S. Paino, **G. Liguori**, S. Ali, N. Mirabella. Expression of urocortin, CRHR1 and CRHR2 in the bovine adrenal gland. XXVIIIth Congress of European Association of Veterinary Anatomists, Paris (France), July 28-31 2010.
2. **G. Liguori**, C. Squillacioti, A. De Luca, S. Paino, N. Mirabella. Studio sull'innervazione dell'epididimo di alpaca (*Vicugna pacos*). Giornate scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita, Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II (Napoli), 25-26 Novembre 2010.
3. **G. Liguori**, R. Lo Muto, N. Mirabella, S. Paino, A. Vittoria. Espressione dell'orexina A del suo recettore 1 nell'epididimo di alpaca (*Vicugna pacos*). Giornate scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita, Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II (Napoli), 25-26 Novembre 2010.
4. **G. Liguori**, S. Tafuri, S. Paino, N. Staiano, A. Vittoria. L'orexina ed il recettore 1 per le orexine nel testicolo di ratto: studio morfofunzionale. VIII Congresso Nazionale dell'Associazione dei Morfologi Veterinari, Ozzano dell'Emilia (Bo), 26-28 Maggio 2011.
5. C. Squillacioti, A. De Luca, **G. Liguori**, S. Paino, N. Mirabella. Expression of urocortin and corticotropin-releasing hormone receptors

in the bovine adrenal gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 416-422, 2011.

6. A. De Luca, C. Squillacioti, S. Alì, S. Paino, G. **Liguori**, A. Di Loria, N. Mirabella. L'Urocortina ed i recettori per il CRH nel surrene bovino. LXV Convegno Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Tropea-Drapia (Vv), 7-10 Settembre 2011.

7. G. **Liguori**, S. Paino, L. Assisi, C. Squillacioti, N. Mirabella, A. Vittoria. Presence and functional role of orexin A and receptor 1 for orexins in testis of the alpaca (*Vicugna pacos*). LXV Convegno Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Tropea-Drapia (Vv), 7-10 Settembre 2011.

8. R. Marrone, G. **Liguori**. La sardella calabrese: processo tradizionale di produzione e valutazione dei punti critici. In: "Il Pesce", n. 6, 2011.

9. G. **Liguori**, C. Squillacioti, A. De Luca, S. Paino, N. Mirabella . Expression of urocortin and its receptors in the rat epididymis. XXIXth Congress of European Association of Veterinary Anatomists, Stara Zagora (Bulgaria), July 25-28 2012.

10. A. De Luca, C. Squillacioti, G. **Liguori**, S. Paino, N. Mirabella. Urocortin and their receptors are expressed in the horse thyroid gland. XXIXth Congress of European Association of Veterinary Anatomists, Stara Zagora (Bulgaria), July 25–28 2012.

11. L. Assisi, S. Tafuri, G. **Liguori**, S. Paino, L.M. Pavone, N. Staiano, A. Vittoria. Expression and role of receptor 1 for orexins in seminiferous tubules of rat testis. *Cell Tissue Res.* 2012, 348: 601-607.
12. C. Squillacioti, A. De Luca, S. Ali, S. Paino, **G. Liguori**, N. Mirabella. Expression of urocortin and corticotropin-releasing hormone receptors in the horse thyroid gland. *Cell Tissue Res.* 2012, doi: 10.1007/s00441-012-1450-4.
13. **G. Liguori**, L. Assisi, C. Squillacioti, S. Paino, N. Mirabella, A. Vittoria. Presence, distribution and steroidogenic effect of the peptides orexin A and receptor 1 for orexins in the testis of the South American camelid Alpaca (*Vicugna pacos*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012, 179: 137-142.
14. S. Valiante, **G. Liguori**, S. Tafuri, R. Campese, R. Monaco, S. Paino, V. Laforgia, N. Staiano, A. Vittoria. Expression of orexin A and its receptor 1 in the human prostate. *J Anat.* 2013, 222: 473-80.
15. **G. Liguori**, S. Paino, N. Mirabella, C. Squillacioti, A. De Luca, A. Vittoria. Expression of Orexin A and its Receptor 1 in the Epididymis of the South American Camelid Alpaca (*Vicugna pacos*). *Anat Histol Embryol.* 2013, doi: 10.1111/ahe.12046. [Epub ahead of print].
16. **G. Liguori**, S. Paino, C. Squillacioti, A. De Luca, E. Langella, N. Mirabella. Innervation and immunohistochemical characteristics of

epididymis in Alpaca camelid (*Vicugna pacos*). *It J Anim Sci* 2013, Vol 12:e15.

17. **G. Liguori**, A. De Luca, C. Squillacioti, S. Paino, E. Langella, S. Ali, N. Mirabella. The urocortinerbic system in the rat epididymis. IX Congresso Nazionale dell' Associazione dei Morfologi Veterinari, Roma, 23-24 Maggio 2013.

18. **G. Liguori**, S. Tafuri, M. Scarfò, N. Staiano, A. Vittoria. The receptor 2 for orexins in the rat testis. VII Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists, July 17-20, 2013, Leipzig.

19. **G. Liguori**, C. Squillacioti, A. De Luca, R. Ciarcia, A. Vittoria, N. Mirabella. Presence and Distribution of Urocortin and its Receptors in the Epididymis of Alpaca (*Vicugna pacos*). *Anat Histol Embryol*. 2014 doi: 10.1111/ahe.12110.

20. A. De Luca, **G. Liguori**, C. Squillacioti, S. Paino, G. Germano, S. Ali, N. Mirabella. Expression of urocortin and its receptors in the rat epididymis. *Reprod Biol* 2014, 14:104-7.

